

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari BOUMEDIENE

Faculté des Sciences Biologiques



Mémoire
Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister

En : Sciences de la Nature

Option : Biotechnologie et Santé

Par : NAKIB Imene

Thème :

Application du test ELISA sandwich dans l'étude de la biodistribution de la toxine Bot III : Corrélation avec les altérations tissulaires avant et après immunothérapie

Soutenu publiquement le 24/11/2009 devant le jury suivant :

M^{me} TOUIL-BOUKOFFA, C.....Professeur.....USTHB.....Présidente
M^{me} LARABA-DJEBARI, F.....Professeur..... USTHB.....Directrice de thèse
M^{me} HAMMOUDI-TRIKI, D.....Maître de conférences...USTHB.....Examinatrice
M^{me} OUSSEDIK-OUMEHDI, H...Maître de conférences...USTHB.....Examinatrice
M^{me} HAMOULI, Z.....Maître de conférences...USTHB.....Examinatrice

Résumé : La toxine Bot III est une neurotoxine de type α purifiée à partir du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, qui l'un des scorpions les plus dangereux en Algérie. Cette toxine se fixe sur le site 3 du canal sodique des cellules excitables et bloque son inactivation.

L'objectif de ce travail est d'étudier la biodistribution de la toxine Bot III au niveau des différents compartiments par application du test ELISA sandwich et d'analyser les effets histopathologiques de cette toxine au niveau des organes (cœur, poumon et foie) en présence et en absence d'immunothérapie après une envenimation expérimentale.

Les résultats de notre étude montrent que la toxine présente une absorption, une distribution et une élimination très rapides. La toxine apparaît dans le sérum 15 minutes après une injection sous-cutanée. Le pic de concentration au niveau des organes et du sérum apparaît après 30 minutes d'envenimation. Après 3 heures la concentration de la toxine devient très faible et après 24 heures la toxine devient quasiment indétectable. Ces résultats montrent que l'envenimation scorpionique est un cas d'extrême urgence qui nécessite une prise en charge rapide et spécifique.

L'étude de la biodistribution est complétée par une analyse des effets histopathologiques de la toxine Bot III au niveau des organes (cœur poumon et foie). L'histologie montre que la toxine Bot III induit des altérations tissulaires représentées par l'hémorragie, l'œdème, l'infiltration des cellules inflammatoires, congestion et épaississement des parois intra-alvéolaires. Ces lésions tissulaires seraient dues à la libération accrue des neurotransmetteurs (catécholamines et acétylcholine) qui vont induire l'activation des phospholipases endogènes.

L'immunothérapie montre que l'immun-sérum spécifique à Bot III provoque une neutralisation partielle des lésions tissulaire. Ceci serait du à la différence de la pharmacocinétique entre la toxine qui présente une distribution rapide et l'anticorps qui présente une distribution moins rapide. Pour cela il est recommandé d'utiliser des fragments neutralisants de taille plus petite.

Mots clés : *Buthus occitanus tunetanus*, venin, toxine Bot III, biodistribution, immun-sérum, test ELISA, histopathologie, immunothérapie.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu de m'avoir guidé vers le chemin de la connaissance et du savoir et de m'avoir donné la chance de faire des études en post graduation.

Mes vifs remerciements vont au professeur LARABA-DJEBARI, F. qui m'a fait l'honneur de m'accepter parmi son équipe en me proposant ce sujet et en me suivant de près tout au long de la réalisation de mon travail. Ses directives avisés, ses conseils, sa disponibilité, son indulgence, sa patience et son immense expérience m'ont été très bénéfiques.

J'adresse mes profonds remerciements au Professeur TOUIL-BOUKOFFA, C. de m'avoir fait l'honneur de présider ma soutenance, aussi d'avoir assuré ma formation de graduation et de post graduation, sa rigueur scientifique m'a été d'une grande utilité.

Je remercie également Madame HAMMOUDI-TRIKI, D. qui a pris sur son temps afin d'examiner mon travail, sa sagesse et son savoir faire m'ont permis d'avancer.

Je remercie Madame HAMOULI, Z. et Madame OUSSEDIK-OUMEHDI qui m'ont honoré en examinant mon travail.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de Biochimie « Biomolécules- mode d'action » qui m'a procuré une ambiance familiale, tout particulièrement le Docteur ADI-BESSALEM qui m'a beaucoup assisté durant ma pratique. Ainsi que le personnel de l'IPA qui nous a reçus au sein du laboratoire « Recherche et développement sur les venin » .

Sans oublier les ingénieurs de laboratoire ; Assia et Souad qui nous ont réuni toutes les conditions nécessaires pour réaliser notre travail. Ainsi que le personnel du laboratoire d'Entomologie qui a mis a notre disposition le matériel nécessaire pour l'histologie.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser mon travail.

Dédicaces

A mes êtres les plus chers : mon père qui m'a toujours orienté et aidé à prendre les bonnes décisions et ma mère qui a toujours prié Dieu pour moi...je les remercie pour leurs sacrifices et j'espère être à la hauteur de leur espérances.

A la mémoire de mes grands parents, que Dieu aie leurs âmes

A mon frères Khaled et mon cousin Ali qui sont toujours près de moi dans les bons et les mauvais moments.

A ma sœur Selma avec qui je partage toute ma vie...je lui souhaite une bonne réussite.

A mes cousins et cousines maternels et paternels, tout particulièrement le petit Nazim.

Sans oublier la promotion de l'Ecole Doctorale en Biotechnologie et Santé ainsi que la PG de Biochimie- Immunologie, spécialement mon amie Wafa.

Abréviations

A : Adénine

Aah : *Androctonus australis Hector*

Aah II : Toxine II du venin de scorpion *Androctonus australis Hector*

ACF : Adjuvant complet de Freund

AIF : Adjuvant incomplet de Freund

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

Bot : *Buthus occitanus tunetanus*

Bot III : Toxine III du venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus*

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

Cys : Cystéine

C_t: Partie C terminale

DL50: Dose létale 50

ELISA: Enzym Likend Immuno Sorbent Assay

Fab et F(ab)₂: Fragment antigen binding

F_{tox}G₅₀: Fraction toxique majoritaire du venin d'Aah

GABA: Acide γ -aminobutyrique

His: Histidine

IgG : Immunoglobuline G

i.p: Intra péritonéale

k_d : Constante de dissociation

Leu : Leucine

OPD : O-Phényl Diamine dihydrochloride

PAF: Platelet Activating Factor

PL: Phospholipase

RIA : Radio Immuno Assay

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

s.c: Sous cutanée

T : Thymine

Val : Valine

Iconographie

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie du scorpion.....	5
a. Le scorpion <i>Androctonus australis Hector</i> .	
b. Le scorpion <i>Buthus occitanus tunetanus</i> .	
Figure 2 : Evolution d'un potentiel d'action en fonction du temps.....	10
a. Différentes phases du potentiel d'action.	
b. Perméabilité aux ions Na ⁺ et K ⁺ .	
Figure 3 : Structure du canal ionique.....	13
Figure 4 : Structure du canal Na ⁺	13
Figure 5 : Toxines actives sur les canaux sodiques.....	15
Figure 6 : Cibles des toxines scorpioniques sur le canal Na ⁺ potentiel dépendant.....	16
Figure 7 : Comparaison de séquences et structure des toxines type α.....	19
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de quelque toxine active sur les canaux sodiques.....	21
Figure 9 : Localisation des ponts disulfures dans les toxines actives sur les canaux sodiques.....	23
Figure 10 : Procédé de purification des treize toxines du venin de scorpion <i>Buthus occitanus tunetanus</i>	24
Figure 11 : Protocole d'envenimation expérimentale des rats.....	34
Figure 12 : Titre en anticorps spécifique à la toxine Bot III testés par ELISA simple.....	39
Figure 13 : Comparaison entre le titre de l'immun sérum brut et précipité par ELISA simple.....	41
Figure 14 : Courbe standard du dosage de la toxine Bot III.....	43
Figure 15 : Evolution du taux de la toxine Bot III dans le sérum et le cœur.....	44
Figure 16 : Evolution du taux de la toxine Bot III dans le poumon et le foie.....	44
Figure 17 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le parenchyme pulmonaire après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h. Coloration H.E. Obj ×40.....	46

Figure 18 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le myocarde après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h. Coloration H.E. Obj ×40.....	47
Figure 19 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le parenchyme hépatique après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h. Coloration H.E. Obj ×40.....	49
Figure 20 : Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot III sur les altérations tissulaires induites par la toxine Bot III. Coloration H.E. Obj ×40.....	51
Figure 21 : Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot sur les altérations tissulaires induites par Bot III. Coloration H.E. Obj ×40.....	52

Liste des tableaux

Tableau I : Les espèces de scorpions dangereuses pour l'homme.....	4
Tableau II : Les principaux symptômes cliniques et gradation des envenimations scorpioniques au Maghreb.....	7
Tableau III : Protocole d'immunisation des lapins.....	31
Tableau IV : Titre en anticorps des immun-sérum en fonction du temps.....	40
Tableau V : Caractéristique des deux immun-sérums après précipitation.....	40
Tableau VI : Concentration de toxines Bot III dans les échantillons testés par ELISA sandwich.....	43

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Rappels bibliographiques

I. Le scorpion.....	3
II. Envenimation et symptômes.....	6
III. Les venins.....	6
IV. Neurotoxines.....	8
IV.1. Toxines longues.....	8
IV.2. Toxines courtes.....	9
V. Le potentiel d'action.....	9
V.1. Les canaux ioniques.....	11
V.2. Physiologie du canal sodium potentiel dépendant.....	12
V.3. Le canal sodique potentiel-dépendant est la cible de plusieurs toxines.....	14
V.4. Toxines de scorpions actives sur les canaux sodiques.....	17
V.4.1. Toxines de type α	18
• Toxines α classiques.....	18
• Toxines α anti-insectes.....	18
• Toxines α like.....	20
V.4.2. Toxines de type β	20
V.5. Structure tridimensionnelle des toxines active sur les canaux sodiques.....	20
VI. La toxine Bot III.....	22
VI.1. Procédé de purification de la toxine Bot III selon Martin-Eauclaire et Rochat (1984).....	22
VI.2. Caractéristiques de la toxine Bot III.....	22
VI.3. Relation structure-fonction.....	25
VII. Traitements anti scorpionique.....	26
VII.1. Traitements symptomatiques.....	26

VII.2. Traitements spécifiques (immunothérapie).....	26
VIII. Biodistribution du venin de scorpion.....	27

Chapitre II : Matériel & méthodes

I. Matériel.....	29
I.1 Matériel biologique.....	29
I.2. Réactifs.....	29
II. Méthodes.....	30
II.1. immunisation des lapins et production d'un immun-sérum anti-toxine Bot III.....	30
II.1.1. Détermination du titre en anticorps des immuns sérums par ELISA simple.....	32
II.1.2. Précipitation des anticorps au sulfate d'ammonium.....	33
II.2. Etude de la biodistribution et quantification de la toxine Bot III.....	33
II.2.1. Préparation des échantillons.....	35
II.2.2. ELISA sandwich.....	35
II.3. Etude des altérations histologiques induites par la toxine Bot III en présence et en absence d'immunothérapie.....	36

Chapitre II : Résultats & discussion

I. Production d'immun-sérum spécifique à la toxine Bot III.....	38
II. Etude de la biodistribution et quantification de la toxine Bot III.....	42
III. Etudes des altérations tissulaire provoquées par la toxine Bot III au niveau des organes ; poumon, cœur et foie.....	45
III.1. Effets de la toxine Bot III sur le parenchyme pulmonaire.....	45
III.2. Effets de la toxine Bot III sur le myocarde.....	45
III.3. Effets de la toxine Bot III sur le parenchyme hépatique.....	48
IV. Effet de l'immunothérapie sur les altérations tissulaires induites par la toxine Bot III	48
IV.1. Effets de l'immun-sérum spécifique à la toxine Bot III.....	48
IV.2. Effets de l'immun-sérum spécifique au venin Bot.....	50

Discussion générale.....	53
Conclusion.....	61
Références bibliographiques.....	63

Introduction

Les envenimations scorpioniques constituent, par leur fréquence et leur gravité, un problème de santé dans plusieurs régions du monde. Selon le ministère de la santé, le nombre de piqûre durant les quinze dernières années en Algérie a connu une forte évolution, passant de 22972 en 1991 à 51180 en 2007, soit un accroissement avec un taux de 122%. Même si le taux de mortalité a connu une forte diminution en passant de 0,46% à 0,15% durant cette période, il n'empêche que le nombre de piqûre annuelle demeure élevé. Le taux de mortalité est passé en moyenne à 70 cas par an, près de 65% des victimes sont des enfants de moins de cinq ans.

Les espèces les plus dangereuses sont *Androctonus australis hector* (Aah) et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot). Ces espèces induisent lors d'une envenimation, l'apparition de symptômes divers (douleur, sudation, hypotension, hypertension, fièvre). Une aggravation de l'état général de l'envenimé se traduira par un œdème pulmonaire suivi d'un arrêt cardiaque (Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari, 2003).

La sévérité de la piqûre du scorpion est due à la composition complexe de son venin qui consiste en la présence de deux fractions; une fraction non toxique composée de peptides, de lipide et de nucléotides, et une fraction toxique composée principalement de toxines pharmacologiquement actives de faible poids moléculaire (environ 7 kDa). La diffusion tissulaire rapide des ces toxines nécessite une intervention et une prise en charge des envenimés dans des délais très brefs (Ismail et Abdessalem, 1988; Ismail *et al.*, 1993).

Les toxines de venin des scorpions sont des neurotoxines qui agissent sur les canaux sodium et potassium, entraînant ainsi une dépolarisation anormale des cellules excitables et une libération accrue des neurotransmetteurs (Martin Eauclaire *et al.*, 1999).

L'immunothérapie constitue à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique contre les envenimations scorpioniques. Elle repose sur l'administration d'anticorps spécifiques qui ont pour effet de complexer, détacher et éliminer les molécules toxiques qui sont à l'origine de troubles graves. Cependant, l'efficacité de cette immunothérapie dépend de plusieurs paramètres tel que la dose de l'anticorps administrée, la voie et le délai de l'injection (Pepin-Covata *et al.*, 1996 ; Rezende *et al.*, 1998).

Cette étude a été entreprise afin de caractériser le rôle de la toxine Bot III ; polypeptide hautement toxique purifié à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*. Cette neurotoxine est active sur les canaux Na^+ . Pour cela nous avons procédé à une envenimation expérimentale d'un model murin afin de caractériser les principaux effets histopathologiques causés par cette toxine. L'application d'un test ELISA sandwich spécifique à cette espèce a été utilisée pour la quantification de la toxine dans les sérums et les organes des animaux envenimés. Cette étude de la biodistribution de Bot III permettrait de proposer des protocoles thérapeutiques efficaces pour neutraliser les effets toxiques du venin.

I. Le scorpion

Les scorpions sont représentés par environ 1500 espèces connues. ils constituent, au sein des arthropodes, un ordre mineur mais d'une grande importance médicale (Gaudrault, 2000 ; Hommel et *al.*, 2000).

Le scorpion appartient à l'embranchement des arthropodes, sous embranchement des Chélicérates, classe des Arachnides, ordre des Scorpions, avec deux sous ordres ; Les *Buthoïdes* (Famille des *Buthidae*) et les *Chactoïdes* (six familles) (Martin-Eauclaire et *al.*, 1999).

Les espèces actuelles sont toutes terrestres, elles sont pourvues d'un exosquelette chitineux articulé qui a la particularité d'être fluorescent en lumière noire (350-370 nm). Les scorpions sont des animaux particulièrement résistants que ce soit au froid, à la chaleur, au jeûne et même aux radiations ionisantes. Ils ont une grande capacité d'adaptation qui leur a permis de s'installer sur tout les continents et dans tout les biotopes y compris sous la neige et dans les zones marines. La queue porte à son extrémité le telson, un appareil venimeux constitué d'une vésicule à venin prolongée par un dard qui permet l'inoculation du venin.

Les principales espèces dangereuses pour l'homme appartiennent la plupart à la famille des *Buthidae* (Tableau I) qui est divisé en :

- Espèces de l'ancien monde qui se localisent en Afrique du nord et en Asie, les espèces les plus importantes sont *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus*, *Buthotus sp*, *Hemiscorpio lepturus*.
- Espèces du nouveau monde constituées par le genre *Centruroides* présent en Amérique du nord et l'Amérique centrale ainsi que le genre *Tityus* qui se localise en Amérique du sud (Possani et *al.*, 1999; Droy et Leroy, 2002).

Les espèces les plus dangereuses présentes en Algérie sont *Androctonus australis hector* et *Buthus occitanus tunetanus* (Figure 1). Ces deux espèces diffèrent par leur couleur et leur taille : *Androctonus australis hector* peut atteindre plus de 10 cm, alors que le scorpion *Buthus occitanus tunetanus* varie de 4.5 à 7 cm.

Tableau I : Les espèces de scorpions dangereuses pour l'homme (Droy et Leroy, 2002)

Ancien Monde		
Genre	Espèce	Distribution
<i>Androctonus</i>	<i>aeneas</i> <i>australis</i> <i>crassicauda</i> <i>mauretanius</i>	Afrique nord saharienne De l'Algérie à l'Egypte De l'Afrique du nord à l'Arabie saoudite Endémique du Maroc
<i>Buthotus</i>	<i>franzwernerii</i> <i>tamulus</i>	Endémique du Maroc Inde
<i>Buthus</i>	<i>occitanus</i>	Pourtour méditerranéen et pays du Sahel
<i>Leiurus</i>	<i>quinquestriatus</i>	Vaste répartition : Afrique, Moyen-Orient
<i>Parabuthus</i>	<i>granulatus</i> <i>sp.</i>	Afrique du sud Afrique de l'est Arabie
<i>Hemiscorpius</i>	<i>lepturus</i>	Irak, Iran
Nouveau Monde		
Genre	Espèce	Distribution
<i>Centruroides</i>	<i>exilicauda</i> <i>infamatus</i> <i>noxius</i> <i>suffusius</i>	Etats-Unis Etats-Unis, Mexique Mexique Mexique
<i>Tityus</i>	<i>bahiensis</i> <i>serrulatus</i> <i>trinitatis</i>	Brésil, Argentine Brésil Trinité



Figure 1 : Morphologie du scorpion

a. Le scorpion *Buthus occitanus tunetanus*

b. Le scorpion *Androctonus australis Hector*

II. Envenimation et symptômes

L'envenimation scorpionique est caractérisée par l'apparition rapide de symptômes dans les 5 à 30 minutes qui suivent la piqûre, témoignant d'une gravité qui dépend de plusieurs facteurs (Ismail et *al.*, 1980). Les facteurs de gravité sont fonction de l'espèce qui cause l'envenimation, sa taille, son âge, sa nutrition, les conditions climatiques de son habitat, la quantité du venin injecté, de sa voie d'introduction (inoculation au niveau des zones richement vascularisées), l'âge du sujet envenimé et le délai de prise en charge (Broglia et Goyffon, 1980; Padilla et *al.*, 2003).

Les symptômes observés lors d'une piqûre par un scorpion vont depuis les signes locaux (réaction inflammatoire et engourdissement) jusqu'à l'état de choc (troubles cardio-circulatoires et respiratoires, coma profond), en passant par des symptômes plus généraux (nausées, vomissements, diarrhées, modification de la pression artérielle, fièvre, prostration) (Laraba-Djebari, 1996).

Une gradation de l'envenimation scorpionique a été établie dans le cadre des réunions de Concertation entre Instituts Pasteur en fonction de la sévérité des symptômes cliniques (ACIP, 1998) (Tableau II).

Tous ces symptômes sont, en général, la conséquence des effets combinés des différents composants contenus dans le venin. Cependant il a été démontré que la toxicité des venins des *Butidae* est principalement due aux toxines de type α .

III. Les venins

Les venins de scorpions sont caractérisés par une grande complexité (Watt et Simard, 1984). Leur glandes venimeuses est caractérisée par la présence d'une variété de composants biologiquement actifs, tel qu'une faible quantité d'enzyme (hyaluronidase, acétylcholine estérase), nucléotides, lipides, peptides (sérotonine, histamine), mucoprotéines, mucopolysaccharides et d'autres substances inconnues (Zoltkin et *al.*, 1978; Possani et *al.*, 1984).

Tableau II : Les principaux symptômes cliniques et gradation des envenimations scorpioniques au Maghreb (ACIP, 1998).

Gradation	Principaux symptômes
Grade I	<p>Signes locaux : douleur, fourmillement</p> <p>Signes généraux : Irritabilité, agitation/obnubilation</p>
Grade II	<p>Signes locaux : douleur, fourmillement</p> <p>Signes généraux : Irritabilité, agitation/obnubilation, sueur, diarrhées, vomissement/nausées, hyper salivation, ballonnement gastrique, extrémités froides, fièvre/ frissonnement, dysrégulation thermique.</p> <p>Signes cardiovasculaires : hypertension, hypotension, tachycardie.</p> <p>Signe respiratoires : cyanose</p> <p>Signes neuromusculaires : priapisme</p>
Grade III	<p>Signes locaux : douleur, fourmillement</p> <p>Signes généraux : Irritabilité, agitation/obnubilation, sueur, diarrhées, vomissement/nausées, hyper salivation, ballonnement gastrique, extrémités froides, fièvre/ frissonnement, dysrégulation thermique.</p> <p>Signes cardiovasculaires : hypertension, hypotension, tachycardie, bradycardie, hypertrophie auriculaire, fibrillation auriculaire et ventriculaire, trouble de la conduction, choc.</p> <p>Signe respiratoires : cyanose, polypnée, dyspnée, mousse aux lèvres, râles crépitant, sécrétion bronchiques, arrêt respiratoire, OAP.</p> <p>Signes neuromusculaires : priapisme, hyperexcitabilité, nystagmus, hémiplégie, prostration, convulsions, troubles de la conscience, coma.</p>

La fraction toxique du venin est représentée par des polypeptides de faible poids moléculaire, ayant comme cible biologique les canaux ioniques impliqués dans la transmission de l'influx nerveux (Catterall, 1977; Garcia *et al.*, 1997).

IV. Neurotoxines

Les neurotoxines des venins de scorpions sont des polypeptides qui agissent sur les membranes des cellules excitables (cellules nerveuses et cellules musculaires). En fonction de leur cible biologique, quatre familles de neurotoxines ont été isolées à partir des venins scorpioniques. Il existe des neurotoxines actives sur les canaux Na^+ (Rochat *et al.*, 1979; Catterall, 1980), les canaux K^+ (Carbone *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1985), les canaux Ca^{2+} (Valdivia *et al.*, 1998). et celles qui agissent sur les canaux Cl^- (Debin *et al.*, 1993).

Les neurotoxines actives sur les canaux sodiques sont responsables de la quasi totalité de la symptomatologie observée lors d'une envenimation, les toxines actives sur les canaux K^+ pourraient potentialiser les effets de la première (Gomez et Dinis, 1966; Possani *et al.*, 1982).

Treize toxines ont été purifiées et identifiées à partir du venin de scorpion *Buthus occitanus Tunetanus* (Martin Eauclaire et Rochat, 1984a). Parmi ces toxines il y a la toxine Bot III active sur les canaux sodiques (Miranda *et al.*, 1970).

Douze toxines ont été purifiées et caractérisées à partir du venin de scorpion *Androctonus australis Hector* (Martin Eauclaire et Rochat, 1984b).

IV.1. Toxines longues

Les toxines longues sont des polypeptides de 6 à 7 kDa, composés de 60 à 70 résidus d'acides aminés, stabilisés par quatre ponts disulfures. Ces toxines sont très toxiques pour les mammifères car elles interagissent spécifiquement avec les canaux Na^+ (Jover *et al.*, 1980; Couraud *et al.*, 1982).

Les toxines longues provoquent deux types de réponses pharmacologiques suivant leur fixation spécifique sur le site 3 ou 4 du canal Na^+ , elles ont été classées en toxines de type α qui se lient au site 3 du canal et ralentissent son inactivation (Tejedor et Catterall, 1988; Gordon *et al.*, 1996; Roger *et al.*, 1996 ; Little *et al.*, 1998), et toxines de type β qui se lient au site 4 du canal et potentialisent son activation (Céstele *et al.*, 1998; Shichor *et al.*, 2002; Mantegazza et Céstele, 2005).

IV.2. Toxines courtes

Les toxines courtes sont des polypeptides de 4 kDa, constitués de 29 à 39 résidus d'acides aminés réticulés par trois à quatre ponts disulfures. Ces toxines sont actives sur les canaux K^+ potentiel-dépendant et calcium-dépendant (Laraba-Djebari, 1996).

En fonction de leur homologie de séquence, elles ont été classées en deux familles. La première famille est constituée de peptides de 29 à 31 résidus d'acides aminés, actifs sur les canaux de types SK apamine-sensible, comporte plusieurs membres; trois peptides d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus* : P01, P02, P05 (Zerrouk et al., 1993), et la leurotoxine de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Abia et al., 1986 ; Castele et Strong, 1986). La seconde famille de 37 à 39 résidus d'acides aminés est subdivisée en 4 sous familles : les Kaliotoxines (*Androctonus mauretanicus*), les Noxiustoxines (*Centruroides noxius*), les Charybdotoxines (*Leiurus quinquestriatus*) et une sous famille relative à la Tsk α (Tityus kappa alpha) de *Tityus serrulatus*.

En plus de leur spécificité et leur taille, les toxines courtes possèdent une structure $\alpha\beta$ commune, constituée d'une hélice α et d'un feuillet β double brin reliés par deux ponts disulfures. Les principales différences existantes étant la longueur de l'extrémité N-terminale qui permet la formation éventuelle d'un feuillet β triple brin et la taille de l'hélice α .

V. Le potentiel d'action

Un influx nerveux consiste en une vague de dépolarisation membranaire transitoire connue sous le nom de potentiel d'action et qui se déplace le long d'une cellule nerveuse (Armstrong et Hill, 1998) (Figure 2).

Le potentiel d'action passe par plusieurs phases :

- La première est une phase ascendante qui correspond à une dépolarisation très rapide (pendant la première milli seconde), cette dépolarisation est causée par une augmentation transitoire de la perméabilité aux ions Na^+ (conductance).

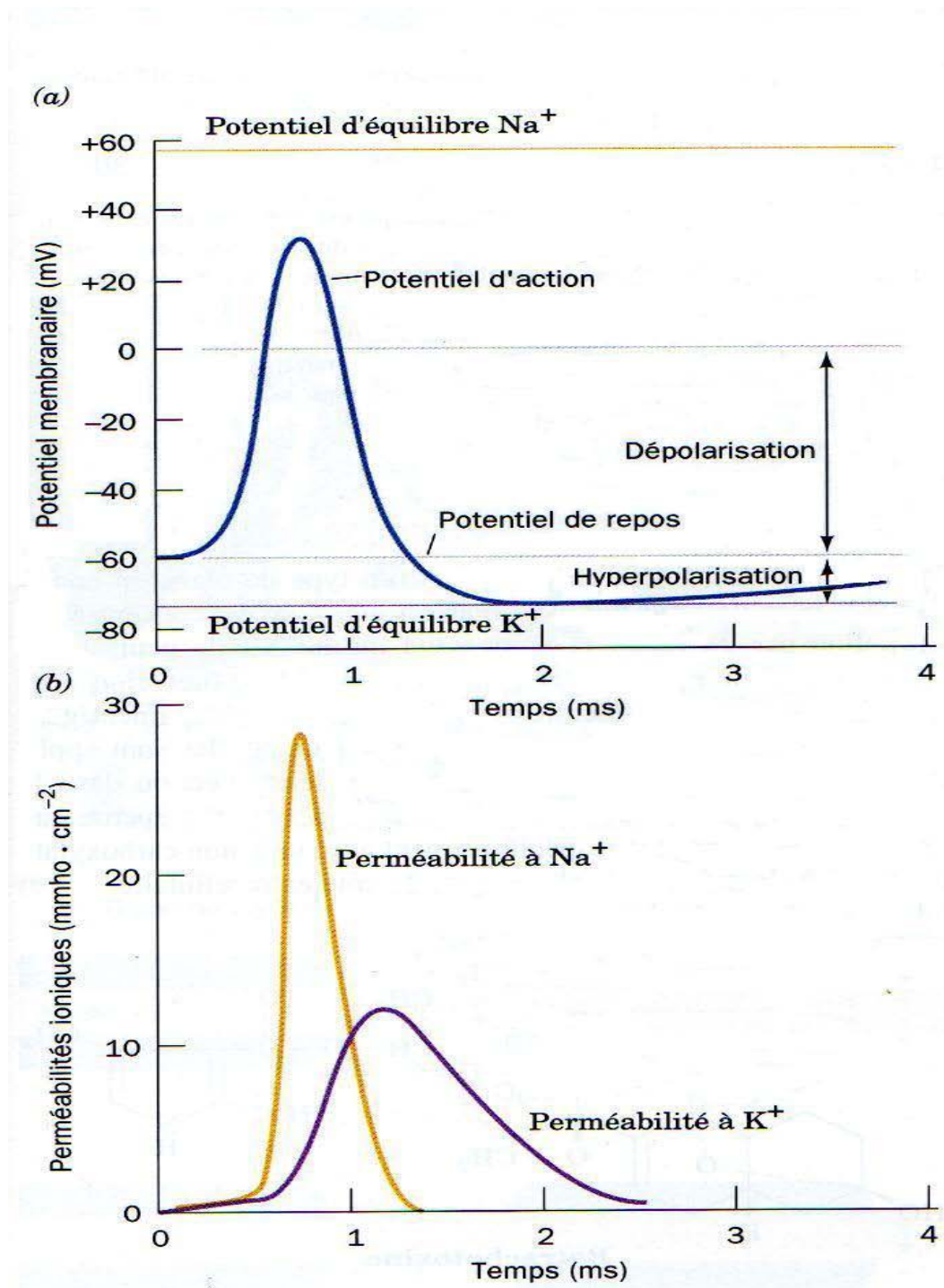


Figure 2 : Evolution d'un potentiel d'action en fonction du temps (Voet et Voet, 2006).

- Différentes phases du potentiel d'action.
- Perméabilité aux ions Na^+ et K^+ .

- Une phase de repolarisation (phase descendante) qui implique deux processus ; l'inactivation graduelle des canaux sodiques et l'ouverture des canaux potassiques, ce

qui va permettre une augmentation de la perméabilité aux ions potassiques. Cette phase va se poursuivre jusqu'à ce que le potentiel de membrane atteigne une valeur plus négative que celle du potentiel de repos ; c'est l'hyperpolarisation.

- Finalement, les canaux potassiques se ferment et le potentiel de membrane est équilibré jusqu'au retour à l'état initial (potentiel de repos) (Hill, 2001; Voet et Voet, 2006).

V.1. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines localisées au niveau des membranes des cellules. Elles forment des pores aux travers desquels les ions traversent la membrane cellulaire. Trois types de canaux ioniques peuvent être distingués selon leur structure et leur spécialisation (Figure 3).

- Canaux ligand-dépendant qui sont des canaux ayant la propriété d'un récepteur (récepteur-canal), leur ouverture est contrôlée par la fixation d'un ligand (neurotransmetteur) et sont impliqués dans la neurotransmission (Récepteurs de l'acétylcholine, GABA, sérotonine) (Hervey-Girard, 2006).
- Canaux signal-dépendant qui s'ouvrent lorsqu'ils fixent des second messagers du coté intracellulaire, (Ion Ca^{2+} ou la sous unité $G_{\beta\gamma}$ d'une protéine G trimérique) (Voet et Voet, 2006).
- Canaux potentiel-dépendant, appelés également tensio-dépendant. L'ouverture de ces canaux est dépendante de la modification de la polarité membranaire. Ils sont retrouvés sur les membranes des cellules excitables (Weil, 2005).

V.2. Physiologie du canal sodium potentiel dépendant

Le fonctionnement de nombreux canaux est contrôlé par la valeur du potentiel de membrane (canaux potentiel dépendant). Le canal sodique potentiel dépendant est un canal cationique présentant une forte perméabilité vis-à-vis des ions sodium et une perméabilité moindre vis-à-vis des autres cations monovalents.

Au potentiel de repos d'une membrane, le canal est principalement dans un état fermé. Une légère dépolarisation (provenant par exemple de l'ouverture d'un canal cationique ligand-dépendant) augmente sa probabilité d'ouverture et entraîne donc une entrée d'ion sodium dans la cellule qui amplifie la dépolarisation initiale. L'ouverture de ces canaux est à la base du potentiel d'action des cellules excitables.

Le canal sodique purifié à partir de cerveaux de mammifères, est un complexe hétérodimère constitué de trois sous unités : α (260 kDa), β_1 (36 kDa) et β_2 (33 kDa). Celui purifié à partir du muscle squelettique de mammifères est constitué des sous unités α (260 kDa) et β_3 (36 kDa) (Laraba-Djebari, 1996).

Le canal sodique isolé à partir de l'électroplaque d'*Electrophorus electricus* est constitué uniquement de la sous unité α , ce qui suggère que cette sous unité est le principal composant des canaux sodiques (Catteral, 1988). Cette sous unité est représentée par une chaîne polypeptidique qui comprend entre 1800 et 2000 résidus d'acides aminés. La chaîne est formée de la répétition de quatre domaines homologues (DI, DII, DIII et DIV). La boucle qui connecte le domaine DIII avec le domaine DIV est en particulier une courte séquence composée de résidus d'acides aminés hydrophobe qui sert à l'inactivation du canal (Yu et Catteral, 2003) (Figure 4).

L'analyse du profil d'hydrophobicité fait apparaître dans chaque domaine, six régions hydrophobes (de S1 à S6) qui représentent six hélices transmembranaires. Le segment S4 est particulier dans la mesure où il présente une répétition régulière de charges positives tous les trois résidus. Il contrôlerait l'ouverture du canal.

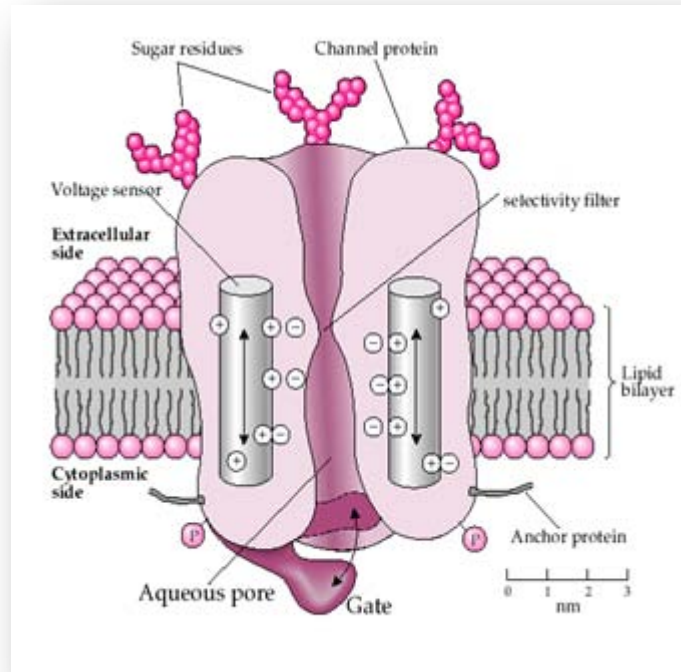


Figure 3 : Structure du canal ionique (Weil, 2005).

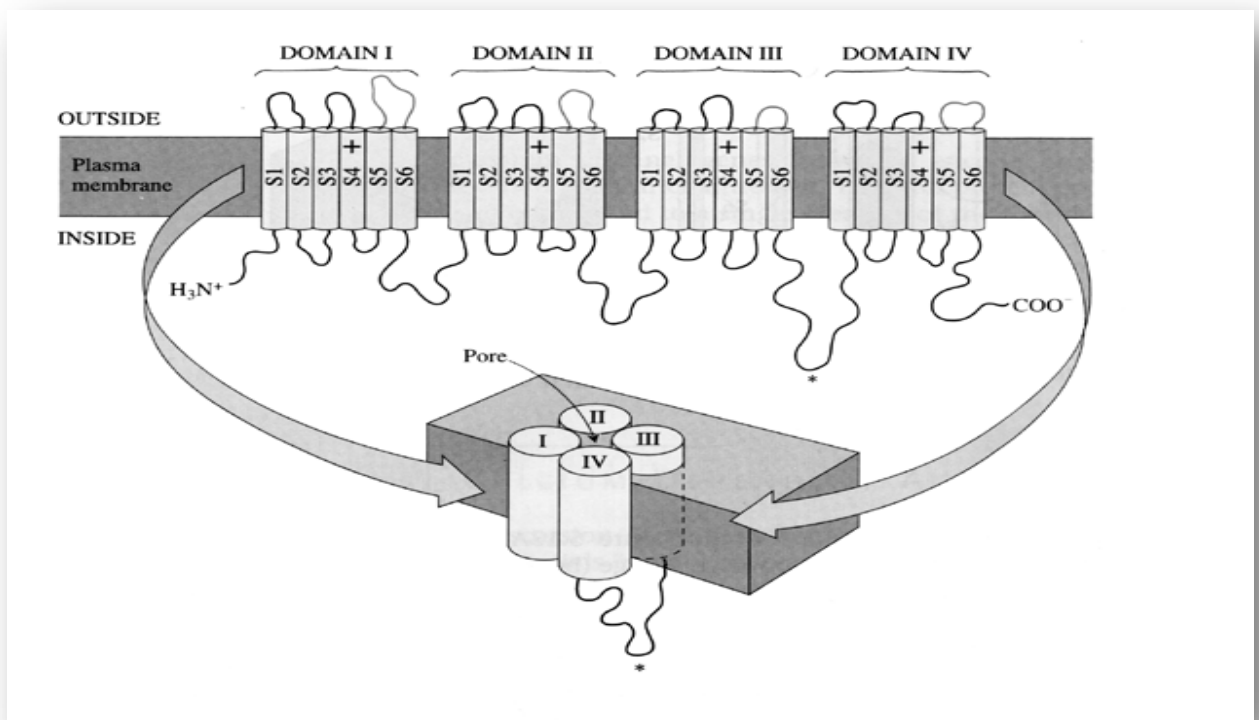


Figure 4 : Structure du canal Na⁺ (Weil, 2005).

Des études structurales indiquent que la région comprise entre les segments S5 et S6 effectue un allé retour à travers une partie de la membrane sous forme d'une courte hélice suivie d'un retour de la chaîne polypeptidique sous une forme relativement étendue. Ces régions se trouvent sur les quatre domaines et sont regroupées dans l'espace et constituent le filtre de sélectivité du pore du canal (Guy et Seetharamulu, 1986; Weil., 2005).

V.3. le canal sodique potentiel-dépendant est la cible de plusieurs toxines

Des études biochimiques réalisées avec des neurotoxines spécifiques ont permis d'identifier essentiellement six sites récepteurs différents sur le canal sodique (Catterall, 1988; Adams et Olivera, 1994) (Figure 5).

- Le récepteur site 1 a été identifié grâce à sa haute affinité avec les neurotoxines possédant un groupement guanidium, telles que la tétrodotoxine, extraite du poisson japonais « tétrodon», La saxitoxine qui a été isolée à partir des dinoflagellés marins (Gitschier et *al.*, 1980; Pauron et *al.*, 1985; Catterall, 1988; Hill, 1992), La μ -conotoxine isolée à partir du venin de mollusque *Conus geographus* entre en compétition avec les deux précédentes sur le site 1 du canal sodique voltage-dépendant (Cruz, 1988).
- Le récepteur site 2 a été identifié grâce à la liaison de toxines alcaloïdes telle que ; la batrachotoxine (BTX); un alcaloïde stéroïdien sécrété par la peau d'une grenouille venimeuse, *Phyllobates aurotaenia*, La veratridine et la grayanotoxine qui sont des alcaloïdes extraites de plantes se fixent sur le site 2 du canal sodique (Soderlund et *al.*, 1989; Dong et *al.*, 1993).
- Le récepteur site 3 et le récepteur site 4 du canal Na^+ interagissent avec des toxines polypeptidiques extraites du venin de scorpion et celle de l'anémone de mer. Le site 3 a été identifié par la liaison de toxines scorpioniques de type α radiomarquée avec l' I^{125} (Lqh α IT et LqqIII) et la toxine ATXII extraite de *Anemonia viridis* (Pauron et *al.*, 1985; Gordon et Zoltkin, 1993; Gille et *al.*, 2002). Le récepteur site 4 a été identifié par sa liaison avec des toxines scorpioniques de type β (AahIT et BjxtrIT) (Zoltkin, 1997; Shichor et *al.*, 2002) (Figure 6).

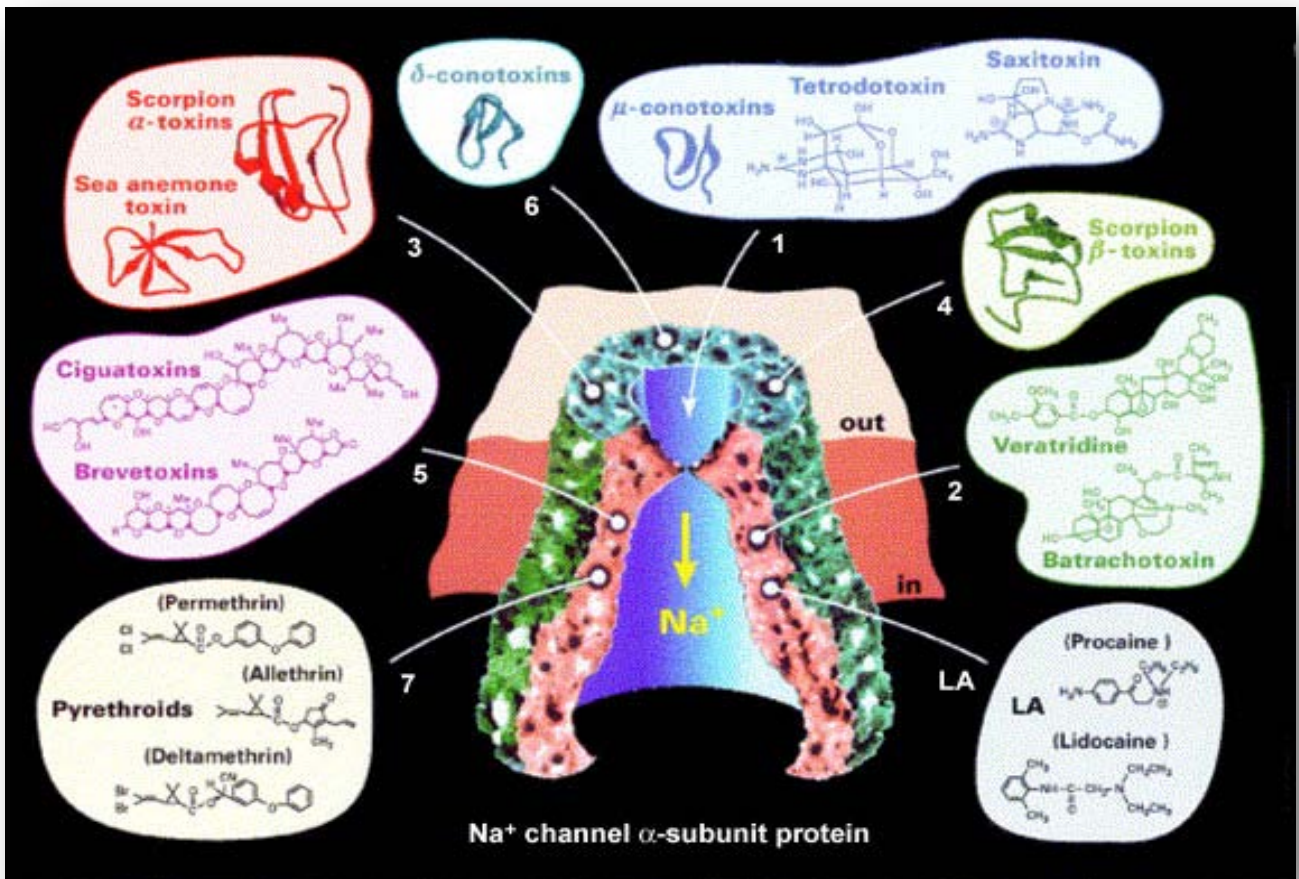


Figure 5 : Toxines actives sur les canaux sodiques (Gordon et al., 2007).

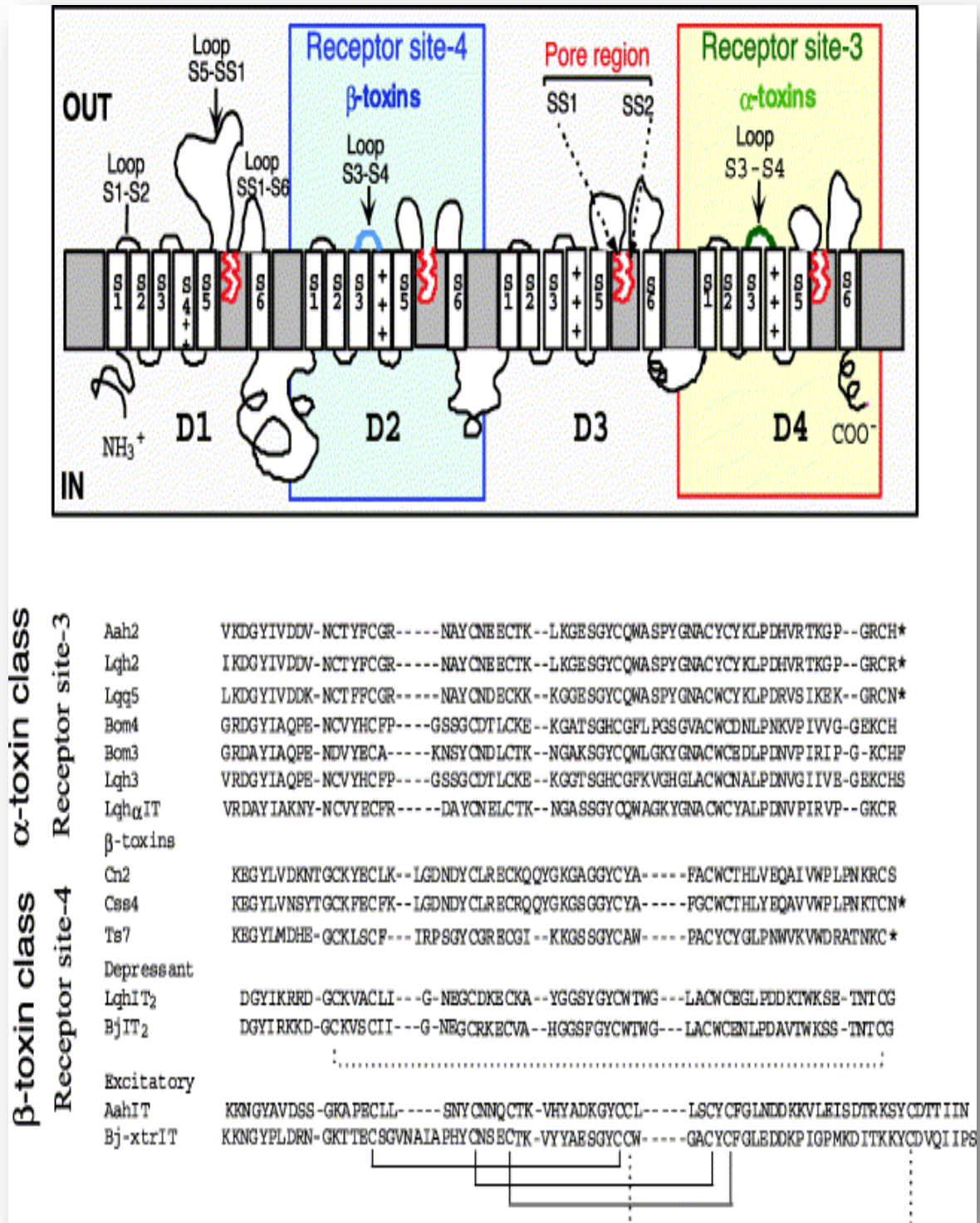


Figure 6 : Cibles des toxines scorpioniques sur le canal Na⁺ potentiel dépendant (Rogers et al., 1996).

- Le récepteur site 5 a été mis en évidence par son interaction avec des toxines polyéther cyclique telles que la brevétoxine (PbTx) extraite du dinoflagellé *Ptychodiscus brevis* et la ciguatoxine extraite du dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* (Baden, 1989; Catterall et al., 1992).
- Le récepteur site 6 a été identifié par la liaison directe de la δ -conotoxine extraite à partir de *Conus textile* marqué à l' I^{125} (TxVIA) (Fainzilber et al., 1994; Shichor et al., 1996).
- Le site 7 interagit spécifiquement avec des pyrétroïdes synthétiques et des anesthésiques locaux (Trainer et al., 1997).

V.4. Toxines de scorpions actives sur les canaux sodiques

Les toxines scorpioniques actives sur les canaux sodiques constituent une faible fraction du poids sec du venin, généralement inférieure à 5%. Ces neurotoxines sont appelées toxines longues et constituent une famille de polypeptides monocaténaux de 7 kDa, constitués de 60 à 70 résidus d'acides aminés (Miranda et al., 1970; Balozet, 1971; Garnier et al., 1989).

Bien que la structure primaire des toxines scorpioniques soit légèrement différente, la structure secondaire montre un motif structural hautement conservé qui est un « core » dense formé d'une hélice α et de deux à trois feuillets β (Rochat et al., 1979; Possani 1984; Menez et al., 1992).

Cette similarité n'empêche pas la spécificité de cibles biologiques, certaines toxines sont actives sur les mammifères, d'autres sur les insectes ou sur les crustacés. Selon leur fixation sur le site 3 ou le site 4 du canal sodium deux types de réponses pharmacologiques sont observées.

V.4.1. Toxines de type α

Les toxines de type α se fixent sur le site 3 du canal sodique et bloquent ainsi son inactivation ce qui induit une prolongation du potentiel d'action.

Cette inactivation se manifeste par une hyperexcitabilité du système nerveux suite à une augmentation de perméabilité aux ions Na^+ et une libération accrue de neuromédiateurs. (Possani *et al.*, 1999; Goyffon et El ayeb, 2002; Mejri *et al.*, 2003).

Ces toxines sont caractéristiques des venins des scorpions de l'ancien monde (*Androctonus*, *Buthus et leiurus*) et sont appelées toxines potentiel dépendantes (Droy et Leroy, 2002). Elles ont été divisées en trois groupes (Figure 7) :

- **Toxines α classiques** : Se sont des toxines très actives sur les mammifères (DL50 = 0.5- 2 ng/g de souris après injection par voie intra-cérébroventriculaire), elles se lient avec une haute affinité aux synaptosomes de rat (K_d 0.2 – 5 nM) et présentent une faible toxicité envers les neurones des insectes (De la vega *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2007).

Ce groupe de toxines comprend Aah II, Bot III, Lqg V, Aah I, Aah III. Aah II est la première toxine α classique identifiée, elle a été marquée à l' ^{125}I et sert de prototype de toxines α actives sur les mammifères (Martin-Eauclaire et Couraud, 1995; Froy et Grevitz, 2003).

- **Toxines α anti-insectes** : Se sont des toxines qui présentent une forte activité vis-à-vis des canaux Na^+ des insectes, tel que : Lqh α IT (Eitan *et al.*, 1990), Lqg III (Kopeyan *et al.*, 1993), et BotIT I (Borchani *et al.*, 1997).

Contrairement aux toxines anti-mammifères, la liaison des toxines anti-insectes aux neurones est indépendante du potentiel (Gordon et Zoltkin, 1993). La toxine Lqh α IT est la mieux étudiée de ce groupe, elle sert de marqueur pour le récepteur site 3 du canal Na^+ des insectes (Gordon *et al.*, 1993).

- **Toxines α like** : Tel que Lqh III, Lqh VI, Bom III, Bom IV et BmkM I. Ces toxines sont actives sur les souris après injection par voie ICV (DL50= 25- 30 ng/ g de souris) mais n'entre pas en compétition avec l' ^{125}I AahII pour la liaison aux synaptosomes de cerveau de rat (Vargas *et al.*, 1987; Krimm *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003).

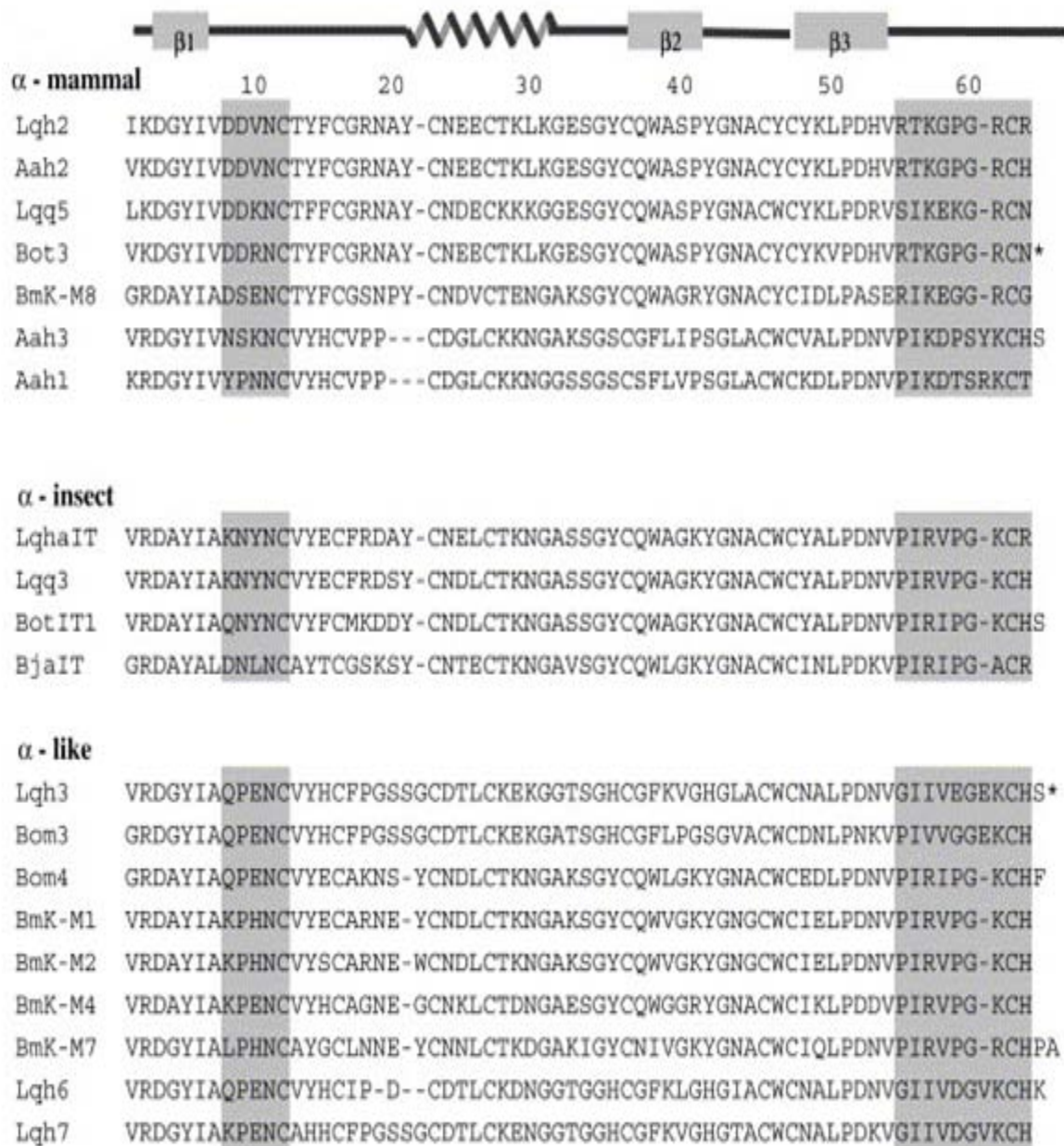


Figure 7 : Comparaison de séquences et structure des toxines type α (Gordon et al., 2007).

Leur activité sur le cerveau de souris les différencie des toxines anti-insecte. Cependant les toxines α -like diffèrent des toxines anti-mammifères par leur toxicité sur les insectes, leur capacité d'entrer en compétition avec la LqII pour la liaison aux membranes des neurones et l'inhibition de l'inactivation du canal Na^+ sur des préparations neuronales d'insectes (Cestéle et *al.*, 1999; Hamon et *al.*, 2002; Brone et *al.*, 2003).

V.4.2. Toxines de type β

Les toxines de type β se fixent sur le site 4 du canal sodique, de manière indépendante du potentiel et déclenchent une série de potentiels d'action répétitive. Ces toxines ont été identifiées dans les venins de scorpions du nouveau monde (*Centrurinae* et *Tityinae*) (Martin-Eauclaire, 1999).

V.5. Structure tridimensionnelle des toxines active sur les canaux sodiques

La première structure tridimensionnelle des toxines actives sur les canaux sodiques a été déterminée par diffraction aux rayons X sur le variant 3 du venin de *Centruroides sculpturatus* (Fontecilla-Camps et *al.*, 1980). D'autres structures tridimensionnelles de toxines ont été également déterminées par RMN et par cristallisation ; Aah IT (Darbon et *al.*, 1991), Aah II (Housset et *al.*, 1994; Fontecilla-Camps et *al.*, 1998), Aah III (Mikou et *al.*, 1992), Lqq III (Landon et *al.*, 1997), Lqh $_{\alpha}$ IT et CLL (Lebreton et *al.*, 1994) et Bj-xtr IT (Oren et *al.*, 1998) (Figure 8).

Généralement, les neurotoxines qui ciblent les canaux sodiques sont des polypeptides monocaténaux, formés de 60-76 résidus d'acides aminés stabilisés par quatre ponts disulfures. Ces toxines sont formées par un core dense hautement conservé, représenté par une hélice α et deux à trois feuillets β (Housset et *al.*, 1994; Mouhat et *al.*, 2004; Ali et *al.*, 2006; Bosmans et Tytgat, 2007).

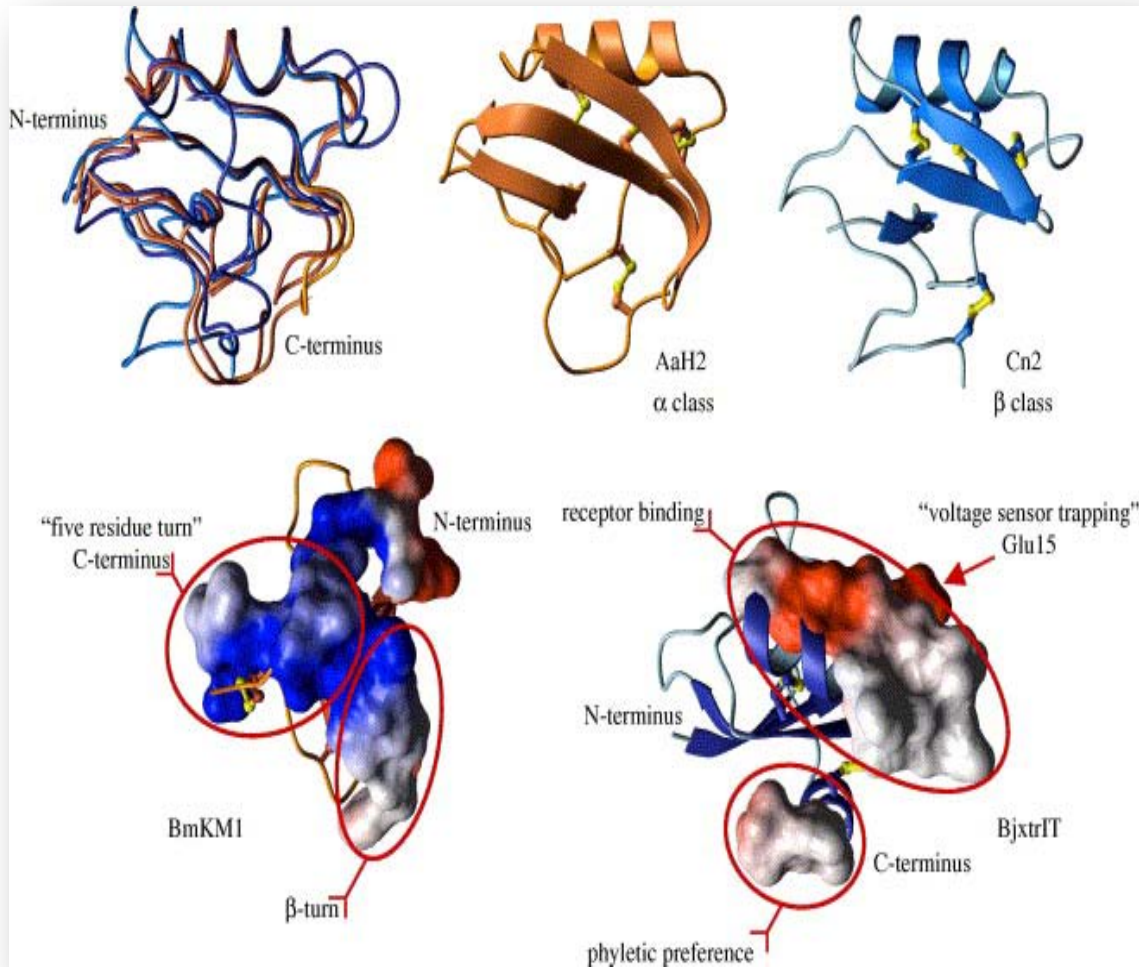


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de quelques toxines actives sur les canaux sodiques (De La Vega et Possani, 2005).

L'hélice α est liée au feuillet β_3 par deux ponts dissulfures (Cys 3 - Cys 6 et Cys4 - Cys 7). Les deux cystéines de l'hélice α (cys 3 et cys 4) sont séparées par un tripéptide, cependant celles du feuillet β_3 sont séparées par un seul acide aminé (cys6 et cys7). Ces éléments structuraux sont conservés dans toutes les toxines actives sur les canaux sodiques. Le troisième pont dissulfure conservé est celui qui est établi entre la cystéine du feuillet β_2 (cys5) et celle du feuillet β_1 (cys 2). Ces trois ponts participent à la stabilisation du core structurale de la toxine. Le quatrième pont est établi entre les deux extrémités N-terminale et C-terminale (cys1 et cys8) (Possani et *al.*, 1999) (Figure 9).

VI. La toxine Bot III

VI.1. Procédé de purification de la toxine Bot III

Dans le but de purifier les neurotoxines qui composent le venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, 35000 scorpions ont été récoltés sur les environs de Mecheria (Algérie). Le venin a été obtenu après stimulation électrique du post abdomen de l'animal avec l'intervalle d'une semaine. Les toxines du venin de *Buthus occitanus tunetanus* ont été purifiées selon les méthodes de purification des biomolécules à faible poids moléculaire. Après extraction aqueuse et dialyse, une série de chromatographie était réalisée ; une chromatographie sur gel de filtration moléculaire ainsi que des chromatographies échangeuses d'ions (Figure 10) (Martin-Eauclaire et Rochat, 1984).

VI.2. Caractéristiques de la toxine Bot III

La toxine Bot III est la toxine la plus active du venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, elle montre une homologie de séquence et une similarité fonctionnelle avec la toxine Aah II purifiée à partir du venin de scorpion *Androctonus australis hector* et sont toutes les deux actives sur les canaux Na^+ au niveau des cellules excitables des mammifères (Martin-Eauclaire et Rochat, 1983; Benkhadir et *al.*, 2004).

Le gène qui code pour la toxine Bot III a révélé deux exons séparés par un intron de 381 pb, la somme des bases A et T représente 75% des nucléotides. La toxine Bot III est composée de 64 résidus d'acides aminés avec un taux élevé d'acides aminés aromatiques, elle possède un peptide signal de 19 résidus.

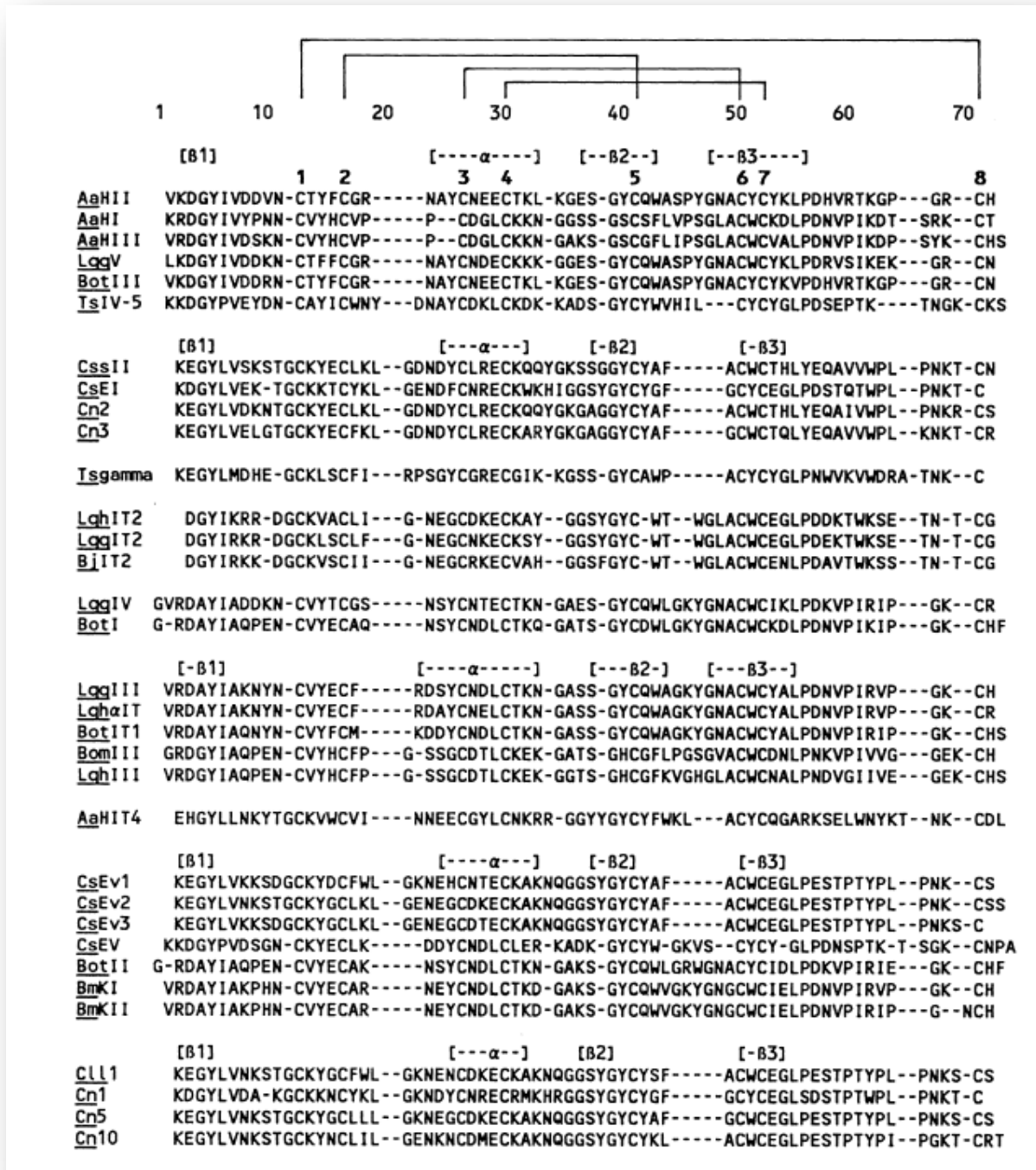


Figure 9 : Localisation des ponts disulfures dans les toxines actives sur les canaux sodiques (Possani et al., 1999).

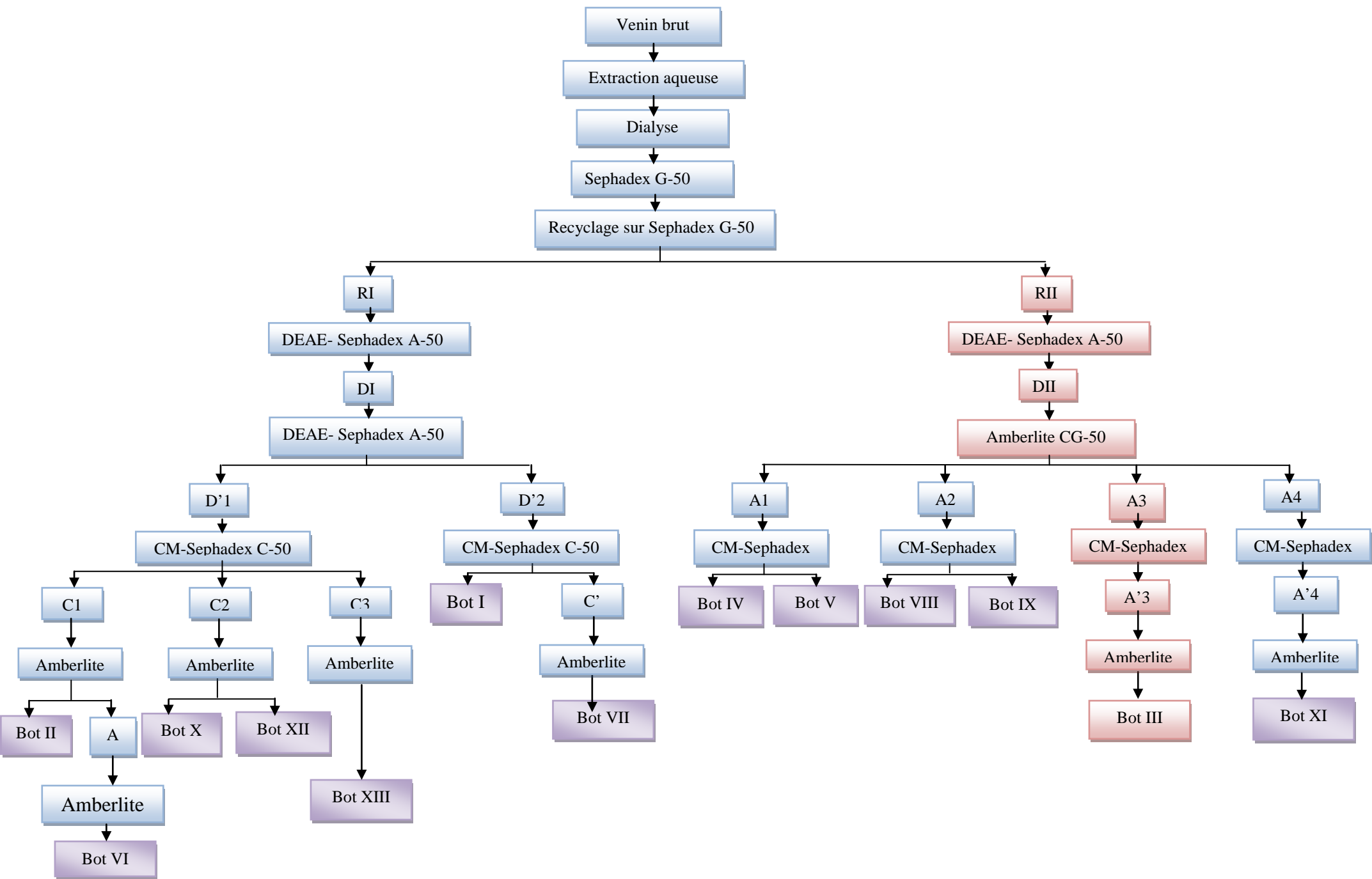


Figure 10 : Procédé de purification des treize toxines du venin de scorpion *Buthus occiatus tunetanus* (Martin-Eauclair et Rochat, 1984a).

La teneur en acide aspartique et asparagine est supérieure à celle de l'acide glutamique et glutamine, c'est l'une caractéristique des toxines α de scorpion (contrairement aux toxines de type β qui possèdent une teneur en acide glutamique et glutamine supérieure à celle de l'acide aspartique et asparagine). La toxine Bot III représente 0,08% des protéines totales qui composent le venin avec un pourcentage de létalité de 2,54% par rapport au venin total et une DL_{50} de 0,03 mg/kg de souris ce qui fait d'elle la toxine la plus active du venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus* (Martin-Eauclaire et Rochat, 1984a).

La toxine Bot III partage 98% d'homologie avec la toxine Aah II, elles diffèrent par une substitution de trois résidus acides aminés seulement ; en position 10 (Arg/ Val), en position 51 (Val/ leu) et en position 64 (Asn/ his). Les deux toxines sont amidées au niveau de leur C_t (Al ayebe *et al.*, 1983; Bougis *et al.*, 1989).

VI.3. Relation structure-fonction

Afin d'établir la relation entre la structure de la toxine Bot III et sa fonction, le gène codant pour cette toxine était cloné et exprimé chez *Escherichia coli*, ainsi une quantité suffisante de toxine recombinante était produite. Cette étude était réalisée par comparaison avec trois toxines mutantes produites par mutagenèse dirigée; la toxine rBot III-OH qui possède la même séquence en acides aminés que la toxine naturelle mais avec un groupement OH dans la partie N_t la toxine rBot III-OH/N64H où la séquence en acides aminés a été modifiée par remplacement de l'asparagine (N) en position 64 par l'histidine (H) et le groupement NH_2 en C_t était remplacé par un groupement OH, et la toxine rBot III-OH/GR qui possède un groupement OH en C_t à la place du groupement NH_2 et une séquence GR ajoutée après l'acide aminé 64 (Benkhadir *et al.*, 2004).

Les tests de toxicité et de liaison des différentes toxines à leur récepteur montrent :

- a) L'affinité de la toxine rBot III-OH pour le canal Na^+ voltage dépendant est réduite, comparant à la toxine Bot III naturelle, cette donnée révèle l'importance de l'amidation au niveau de la région C_t pour l'activité biologique de la toxine Bot III.
- b) La mutation unique N64H est responsable de la différence de toxicité et de l'affinité avec la toxine rBot III-OH.

- c) L'addition de la séquence GR à rBot III-OH induit la perte de l'activité biologique de la toxine mutée.

Ces résultats sont en accord avec le rôle important attribué à la partie C_t des α toxines concernant leur interaction avec le site 3 du canal Na⁺. Les règles qui gouvernent la relation structure-fonction, la localisation du site toxique des toxines de type α ainsi que les bases moléculaires de leur activité biologique et leur sélectivité reste à déterminer (Benkhadir et *al.*, 2004).

Cependant, il a été rapporté que les toxines actives sur les canaux Na⁺ possèdent un motif hydrophobe hautement conservé constitué essentiellement de résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes, ce motif représente probablement le site actif de la toxine (Fontecilla-Camp et *al.*, 1988; Sun et *al.*, 2003).

VI. Traitement anti-scorpionique

La sévérité des symptômes et le taux élevé de mortalité, notamment chez les enfants font que l'envenimation scorpionique nécessite un traitement spécifique et symptomatique appropriés et précoces (Krifi et *al.*, 2002).

VII.1. Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques consistent à traiter les symptômes cliniques observés chez les personnes envenimées. Ces traitements varient selon l'état de gravité de la victime (Goyffon et Chippaux, 1990).

Les personnes envenimées appartenant au grade I sont traitées par l'administration d'antalgique et d'antihistaminique destinés à combattre les effets allergiques du venin. Les personnes envenimées appartenant au grade II nécessitent une administration d'anticonvulsivants (antiépileptique) tel que la benzodiazépine. L'hospitalisation d'urgence avec une assistance respiratoire et un remplissage cardiovasculaire sont nécessaires pour le traitement des envenimées de grade III.

VII.2. traitement spécifique (immunothérapie)

L'immunothérapie est le seul traitement spécifique des envenimations scorpioniques (De Rezende et *al.*, 1995; Laraba-Djebari, 1996; Ghalim et *al.*, 2000; Krifi et *al.*, 2001). Néanmoins, l'existence d'une réelle efficacité d'anti-venin utilisé reste un sujet de controverse (Abroug, 2002).

Les anticorps sont préparés à partir d'animaux immunisés avec du venin en quantité croissante associé à un adjuvant favorisant la présentation des antigènes au système immunitaire (Rivière et Bon, 1999).

Autrefois, utilisés brut, les sérums ont connu des améliorations successives en vue d'une plus grande efficacité et d'une meilleure tolérance. Les cellules sanguines et les protéines non immunes sont éliminées respectivement par centrifugation puis par précipitation au sulfate d'ammonium.

L'efficacité de l'immunothérapie dépend des conditions d'applications de l'anti-venin (la dose, la voie d'administration et le délai d'injection) et de la qualité de l'anti-venin (pureté et pouvoir de neutralisation) (Krifi et *al.*, 1995). Le délai d'administration de l'immun-sérum est un facteur important lors d'une envenimation. Il existe un délai limité au-delà duquel l'action du venin devient irréversible, rendant l'immunothérapie totalement inefficace (Krifi et *al.*, 2002). Cependant, il a été reporté que l'administration d'une forte concentration d'immun-sérum même après un long délai d'envenimation, peut induire une déstabilisation des toxines et les détacher de leur cible.

VII. Biodistribution du venin de scorpion

Les études de la distribution du venin sont généralement réalisées par deux méthodes : Enzym Likend Immuno Sorbent Assay « ELISA » et Radio Immuno Assay « RIA ». Ces techniques permettent de définir quelques paramètres importants pour la compréhension de la pharmacocinétique de l'envenimation.

Le test ELISA sandwich permet de quantifier le venin libre dans le sérum des personnes envenimées et des animaux de laboratoire et au niveau des organes au cours d'une étude expérimentale. Cette technique a été utilisée pour la première fois par Theakston (1977) pour détecter les antigènes du venin ophidien et les anticorps circulants chez des patients envenimés.

Elle a été également utilisée par De Rezende et ses collaborateurs (1995) pour mesurer la concentration sérique du venin au moment de l'hospitalisation des patients envenimés par le scorpion *Tityus serrulatus*. Revelo et ses collaborateurs (1996) ont étudié la distribution du venin de scorpion *Tityus serrulatus* dans le sérum, les différents organes (cœur, rein, cerveau, foie et rate) et au niveau du site d'injection.

Ghalim et ses collaborateurs (2000) ont déterminé la capacité neutralisante de l'anti-venin et la quantité du venin présente dans le sérum après immunothérapie chez les patients envenimés par le scorpion *Androctonus mauritanicus mauritanicus*. Krifi et ses collaborateurs (2000) ont étudié les paramètres pharmacocinétiques du venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus* grâce au test ELISA sandwich. La quantification du venin de scorpion *Androctonus australis hector* a été réalisée par ELISA dans le sérum des personnes et des rats envenimés avant et après immunothérapie (Hammoudi-Triki et al., 2004).

Des études de la biodistribution et de la pharmacocinétique des venins ont été également réalisées par RIA. Ismail et ses collaborateurs (1980) ont utilisé cette technique dans l'étude de la distribution du venin d'*Androctonus amoreuxi* marqué à l' I^{125} injecté à des lapins. Hammoudi-Triki et ses collaborateurs (2007) ont adopté cette technique pour mettre en évidence la toxicocinétique du venin de scorpion *Androctonus australis hector* chez un modèle expérimental de rats.

En plus de l'étude de la biodistribution du venin total, celle de quelques toxines qui composent le venin scorpionique a été déterminée, comme c'est le cas pour les toxines Aah I, Aah II et Aah III. Ce sont des neurotoxines qui composent le venin de scorpion *Androctonus australis hector*. Leur biodistribution a été établie par Devaux et ses collaborateurs (2004) en utilisant les deux techniques ; ELISA sandwich et RIA.

Les résultats de ces études indiquent que la distribution du venin de scorpion est très rapide ce qui rend l'envenimation scorpionique un cas d'extrême urgence qui nécessite une intervention thérapeutique rapide.

I. Matériel

I.1 Matériel biologique

- **Lapins :** Les lapins Albinos de Nouvelle-Zélande (2.6 kg et 2.7 kg) ont été fournis par l'Animalerie de l'Annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba).
- **Les rats :** les rats Wistar (150 \pm 20g) ont été fournis par l'Animalerie de l'Annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba).
- **Toxine Bot III :** Elle nous a été gracieusement envoyée par le Docteur Marie-France Martin-Eauclaire.
- **Le venin de Bot :** Fourni par le laboratoire de recherche et de développement sur Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.
- **Conjugué anti Ig de lapin :** Fourni par le laboratoire Sigma (USA).
- **Conjugué anti venin Bot total :** Préparé par notre équipe (non commercialisé).
- **Immun-sérum spécifique à Bot :** Préparé par notre équipe (non commercialisé).

I.2. Réactifs

Les réactifs et les produits chimiques utilisés dans cette étude sont de nature analytique et proviennent de plusieurs firmes.

Acide chloridrique provient de Labosi (France). Acide sulfurique (H_2SO_4), Bicarbonate de sodium ($(HCO_3)_2Na$), Carbonate de sodium (Na_2CO_3), Eau oxygénée (H_2O_2), Ethanol, Formol, Oxyde de sodium (NaOH), Sulfate d'ammonium, Tween₂₀ et Xylène proviennent de Merck (Allemagne). Acide acétique, Chlorure de sodium (NaCl), Dipotassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4), Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), proviennent de Pancreac (Espagne). La gélatine est fournie par le laboratoire Pharmacia (Suède).

La paraffine est fournie par Biotrol (France). Adjuvent de Freund Complet, Adjuvent de Freund incomplet, Eosine, Hématoxyline, O-Phenyl diamine dihydrochloride (OPD) fournis par Sigma (USA).

II. Méthodes

II.1. immunisation des lapins et production d'un immun-sérum anti-toxine Bot III

La préparation de l'immun-sérum anti-toxine Bot III a été effectuée après immunisation de deux lapins (environ 2 Kg chacun) par la toxine Bot III purifiée à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*.

L'immunisation des lapins était entreprise avec des doses croissantes de la toxine Bot III. Les injections de la solution de toxine sont effectuées par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale de l'animal avec une semaine d'intervalle (Tableau III).

Pour la première injection, la solution de toxine (1 ml) est mélangée avec l'adjuvant de Freund Complet (V/V). L'adjuvent incomplet de Freund est utilisé lors de la deuxième injection.

Des saignées sont effectuées chaque semaine avec prélèvement de sang au niveau des veines de l'oreille de l'animal immunisé. Le sang prélevé est laissé décanter à 37°C pendant une heure, il subira une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes. Le titre en anticorps spécifiques à la toxine Bot III est déterminé par la technique ELISA simple. Le sacrifice des animaux immunisés a lieu lorsqu'un titre optimal est obtenu.

Tableau III : Protocole d'immunisation des lapins

Jour	Quantité de toxines injectée par lapin (μg)	Volume d'adjuvent	Numéros de saignée
1	5	1 ml (ACF)	S ₀
8	10	1 ml (AIF)	/
15	15	/	S ₁
22	20	/	S ₂
29	30	/	S ₃
36	/	/	S ₄
38	/	/	Sacrifice

ACF : Adjuvent complet de Freund

AIF : adjuvent incomplet de Freund

II.1.1. Détermination du titre en anticorps des immuns sérums par ELISA simple

Le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) est une technique immuno-enzymatique réalisée sur une plaque de microtitration. Elle permet de doser qualitativement et quantitativement n'importe quel antigène ou anticorps dans un liquide biologique (Ternynck et Avrameas, 1991).

Cette technique consiste à fixer l'antigène dans des puits d'une microplaque, suivie d'une incubation en présence de l'échantillon sérique à tester. Les anticorps spécifiques vont pouvoir réagir avec les antigènes fixés, il se formera alors un immun-complexe « antigène-anticorps ». L'utilisation d'un conjugué obtenu par couplage d'une enzyme à l'anticorps, permet d'associer une réaction immunologique à une réaction enzymatique. La formation du complexe est mise en évidence par l'apparition d'un produit coloré formé suite à l'action de l'enzyme sur un substrat chromogénique. L'intensité de la réaction colorée est proportionnelle à la quantité en anticorps présent dans le sérum à tester.

La réaction est entreprise de la manière suivante : Dans un premier temps, la microplaque est sensibilisée avec une solution de venin de Bot dissout dans du tampon carbonate/ bicarbonate (0,1M, pH 9,5) à raison de 5 µg/ml puis incubée une nuit à 4°C.

Après une série de quatre lavages et une saturation de la microplaque avec du lait écrémé 5% dans le tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) contenant du tween₂₀ 0,1%, la microplaque est incubée à 37°C pendant une heure, et lavée quatre fois avec du tampon PBS tween₂₀ 0,1%. Une série de dilutions successives des échantillons sériques de 1/2 en 1/2 est effectuée dans le tampon PBS-lait écrémé 5% et déposée en « duplicate » à raison de 100 µl par puits. La plaque est ensuite incubée pendant une 1 heure à 37°C et lavée quatre fois avec un tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) tween₂₀ 0,1%.

Le conjugué (anti IgG de lapin couplé à la peroxydase) dilué à 1/2000 dans du tampon PBS-lait écrémé 5% est déposé à raison de 100 µl par puits. La microplaque est incubée pendant une heure à 37°C suivie par une série de quatre lavages.

La réaction immuno-enzymatique se développe à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes après l'addition du substrat (O-Phényl Diamine dihydrochloride « OPD ») à raison de 20 mg dissout dans 20 ml de tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4) en présence de 20 µl de H₂O₂ à 30%.

La réaction est arrêtée par addition de 50 µl de H₂SO₄ 2N. La lecture de l'absorbance est réalisée à 490 nm. Le titre en anticorps des échantillons sérique correspond à l'inverse de la dernière dilution ayant donné une réaction positive.

II.1.2. Précipitation des IgG au sulfate d'ammonium

Les protéines sont précipitées par les sels neutres à température ambiante, sans dénaturation. Cet effet s'explique par une déshydratation des groupes hydrophiles des protéines.

Les sels les plus fréquemment utilisés sont les sels bivalents tels que le sulfate de sodium (Na₂⁺)SO₄⁻² ou sulfate d'ammonium (NH₄⁺)SO₄⁻². Ce dernier est utilisé pour la précipitation des protéines.

Dans un premier temps, l'échantillon est dilué dans une solution de NaCl 0,9%. La précipitation se fait par addition d'un volume précis de sulfate d'ammonium saturé à 40%, ce volume est ajouté dans de la glace pilée pour éviter la dénaturation des protéines. Après incubation du mélange une nuit à 4°C, les anticorps sont récupérés après centrifugation à 3000 g pendant 20 min. Le culot est repris dans un volume minimal de sulfate d'ammonium à 33% puis centrifugé à 3000 g pendant 20 min. Le culot final est repris dans un volume minimal de NaCl 0,9% puis soumis à une dialyse de 48 heures contre l'eau distillée.

II.2. Etude de la biodistribution et quantification de la toxine Bot III

L'étude de la distribution au niveau des compartiments de l'animal à été effectuée après injection d'une dose sublétales de la toxine Bot III par voie sous-cutanée à des rats (Figure 11).

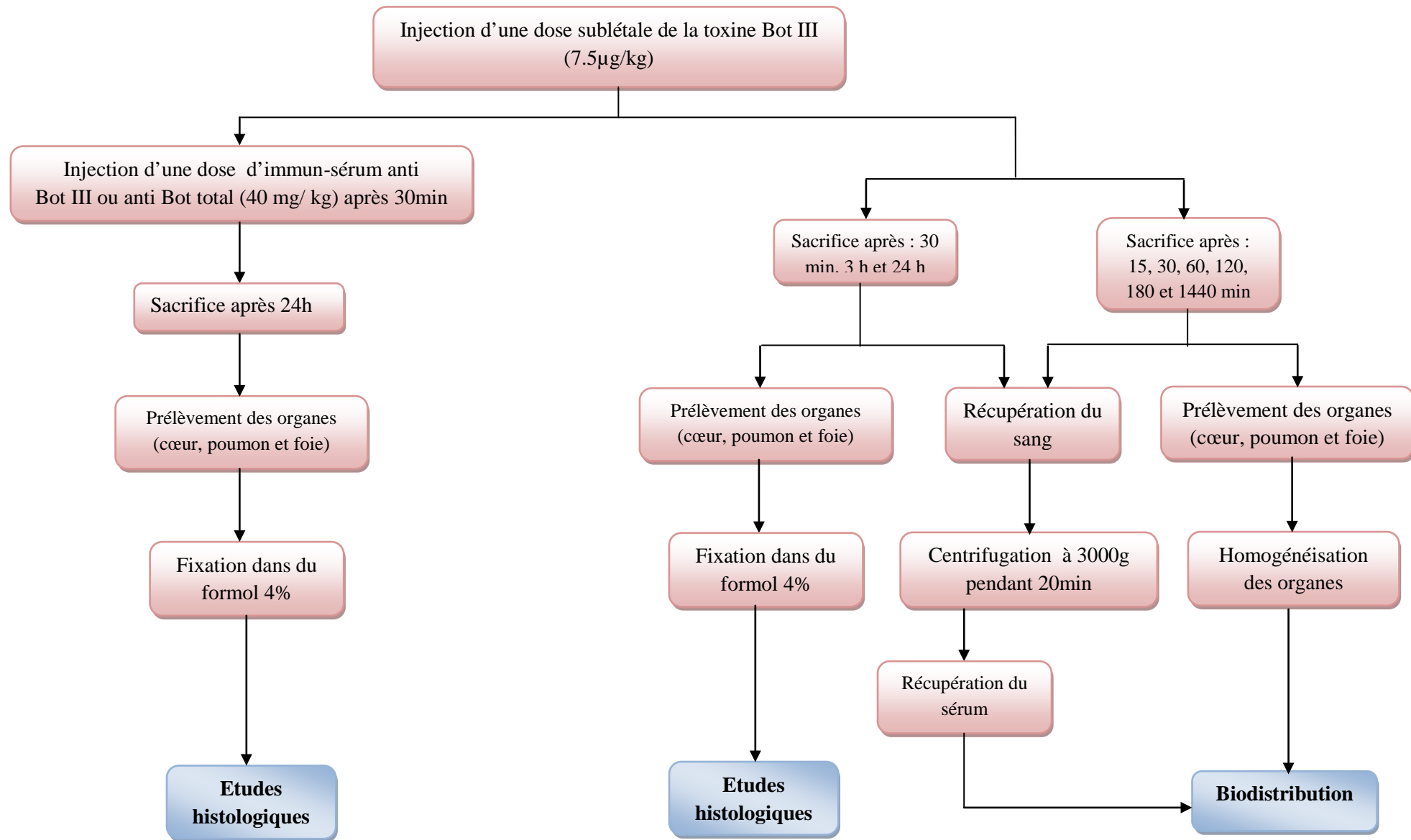


Figure 11 : Protocol d'envenimation expérimentale des rats.

II.2.1. Préparation des échantillons

Les organes prélevés après sacrifice des animaux sont mis dans de l'eau physiologique. Les organes (cœur, poumon et foie) sont ainsi broyés et les homogénats sont centrifugés à 3000 g pendant 20 min. de l'autre coté le sang récupéré après sacrifice est mis à décanter 1 nuit à 4°C ensuite centrifugés à 3000 g pendant 20 min. Les surnageants des homogénats et les sérums sont conservés et serviront ensuite à la quantification de la toxine Bot III.

II.2.2. ELISA sandwich

L'étude de la biodistribution et la quantification de la toxine Bot III dans les différents organes (cœur, poumon et foie) ainsi que dans les sérums des animaux envenimés est entreprise à l'aide d'un test ELISA sandwich (mis au point par notre équipe).

Une microplaque est sensibilisée par des IgG totaux purifiés à partir du sérum de lapin immunisé avec la toxine Bot III, à une concentration de 10 µg/ml, dilué dans du tampon carbonate/bicarbonate (0,1M, pH 9,5).

Après incubation une nuit à 4°C, la microplaque est lavée trois à quatre fois avec du PBS – tween₂₀ 0,1%. Une saturation avec une solution de lait écrémé 5% diluée dans du PBS (0,1 M, pH 7,4) contenant du tween₂₀ à 0,1% est effectuée et la microplaque est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C. Des lavages ont été ensuite effectués avec du PBS-tween₂₀ 0,1% afin d'éliminer les composants non spécifiques.

Une gamme de toxine allant de 0,5 à 6 ng/ml ainsi que les échantillons sont déposés en « duplicate ». Après 1 heure d'incubation à 37°C, suivie des lavages successives le conjugué (anti venin de Bot couplé à la peroxydase) dilué à 1/400 est déposé. La microplaque est encore incubée pendant 1 heure à 37°C suivie des lavages au PBS-tween₂₀ 0,1%.

La révélation s'effectue après addition d'une solution de substrat-chromogène constituée, respectivement, de l'eau oxygénée (H₂O₂) et de l'OPD, à raison de 20 mg dissout dans 10 ml de tampon phosphate dilué dans du tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4). Après incubation 20 minutes à l'obscurité, la réaction est arrêtée par le dépôt de l'acide sulfurique 2N. La lecture de l'absorbance est effectuée à 490 nm.

II.3. Etude des altérations histologiques induites par la toxine Bot III en présence et en absence d'immunothérapie

Parallèlement à l'étude de la biodistribution par ELISA sandwich, une étude histologique a été réalisée sur les organes de l'animal afin de déterminer les effets de la toxine Bot III sur les différents tissus.

L'étude histologique permet de visualiser par microscopie photonique, l'état des tissus et des cellules des organes après envenimation avec un venin ou une toxine particulière ou après neutralisation par un anti-venin ou un anti-toxine spécifique (Figure 11).

Cette études a été effectuées sur les organes ; (cœur, poumon et foie) afin de déterminer les effets d'une dose sublétales de la toxine Bot III ainsi que les effets neutralisants de l'immunosérum spécifique à la toxine Bot III. Elle se déroule en plusieurs étapes :

- La fixation des organes se fait par immersion dans le formol 4% pendant de 48 heures suivie d'une déshydratation dans des bains d'éthanol de degrés croissants, allant de 70 à 100° et d'un éclaircissement des organes à l'aide d'un solvant non miscible à l'éthanol « le xylène ».
- L'imprégnation des organes dans deux bains de paraffine (1 h et 24 h) à 60° C est suivie de la confection des blocs après inclusion des organes dans la paraffine à l'aide des barres de Leuckart.
- Des coupes de 7µm d'épaisseur sont réalisées grâce à un microtome. après avoir taillé les blocs sous forme de trapèze.
- L'étalement des coupes sur les lames s'effectue avec l'eau gélifiée suivi d'un déparaffinage avec chauffage des lames puis leur imprégnation dans deux bains de xylène. La réhydratation s'effectue à l'aide de l'éthanol à degré décroissant (100° à 70°) suivie d'un lavage avec l'eau distillée.

- Coloration des coupes d'organes par la méthode d'hématoxyline-éosine qui est la base de la plus part des examens microscopiques (Dubreuil et Canivenc, 1967). L'hématoxyline colore les noyaux en brun-violacé, le cytoplasme est coloré en rose par l'éosine qui donne une teinte allant de l'orange au rouge pour les hématies (Hould, 1984).
- La coloration est suivie d'une déshydratation des coupes et leur montage entre lame et lamelle avec une résine hydrophobe appelée « Eukitt».
- L'observation des coupes est réalisée grâce à un microscope photonique « Motic » et la prise des photos s'effectue grâce au logiciel « motic-image ».

I. Production d'immun-sérum spécifique à la toxine Bot III

Le contrôle de la production d'anticorps lors de l'immunisation des lapins par des injections sous cutanées dorsales à un intervalle de temps d'une semaine, a été réalisé par le test ELISA simple. Ainsi les titres des deux immun-sérums ont été déterminés. Le dosage est réalisé avec une microplaque sensibilisée avec 5 µg/ ml du venin total de Bot.

Les titres sont déterminés à partir d'une représentation graphique donnant la variation de l'absorbance en fonction de l'inverse de la dilution des sérums (Figure 12). Ceci montre que le taux d'anticorps des immun-sérums expérimentaux augmente de manière proportionnelle en fonction du nombre d'injection. Un titre optimal est obtenu après injections répétées de la toxine Bot III qui provoquent une réponse secondaire.

La première injection j_1 induit une réponse primaire caractérisée par une reconnaissance d'Ag et production d'IgM. La deuxième et la troisième injection du même Ag (J_8 et J_{15}) induisent une réponse secondaire caractérisée par la production d'anticorps de type IgG. Dès le 22ème jour c'est la phase de croissance ; les titres en anticorps des immun-sérums expérimentaux des lapins augmentent de manière proportionnelle avec le nombre d'injection jusqu'à atteindre un titre optimal. Au J_{22} (S_2) le lapin 1 a donné un titre de 6400 et le lapin 2 a donné un titre en anticorps de 800. Le jour J_{29} le titre en anticorps est arrivé à 12800 pour le lapin 1 et 1600 pour le lapin 2. Après injection de la dernière dose de la toxine le titre a atteint 25600 chez le lapin 1 et 6400 chez le lapin 2 (Tableau IV).

Quantitativement, l'immun sérum du lapin 1 présente un meilleur titre par comparaison avec celui du lapin 2, donc le lapin 1 a mieux répondu à la toxine Bot III par rapport au lapin 2. Cette différence est expliquée par le fait que les CPA interviennent dans les premières phases de la réponse immunitaire, en dégradant l'Ag et en le présentant sous forme élémentaire aux lymphocytes T en association avec des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité sur leurs membranes.

Cette activité fondamentale des macrophages est plus au moins efficace selon les individus et peut être modifiée par différents agents immunomodulateurs. Ces variations individuelles sont en partie sous contrôle génétique (Bach et Chatenoud, 2002).

La précipitation des deux immun-sérums par le sulfate d'ammonium a diminué le titre en anticorps de moitié. Le titre de l'immun-sérums du lapin 1 est passé à 12800 et celui du lapin 2 est passé à 6400 (Tableau V, Figure 13).

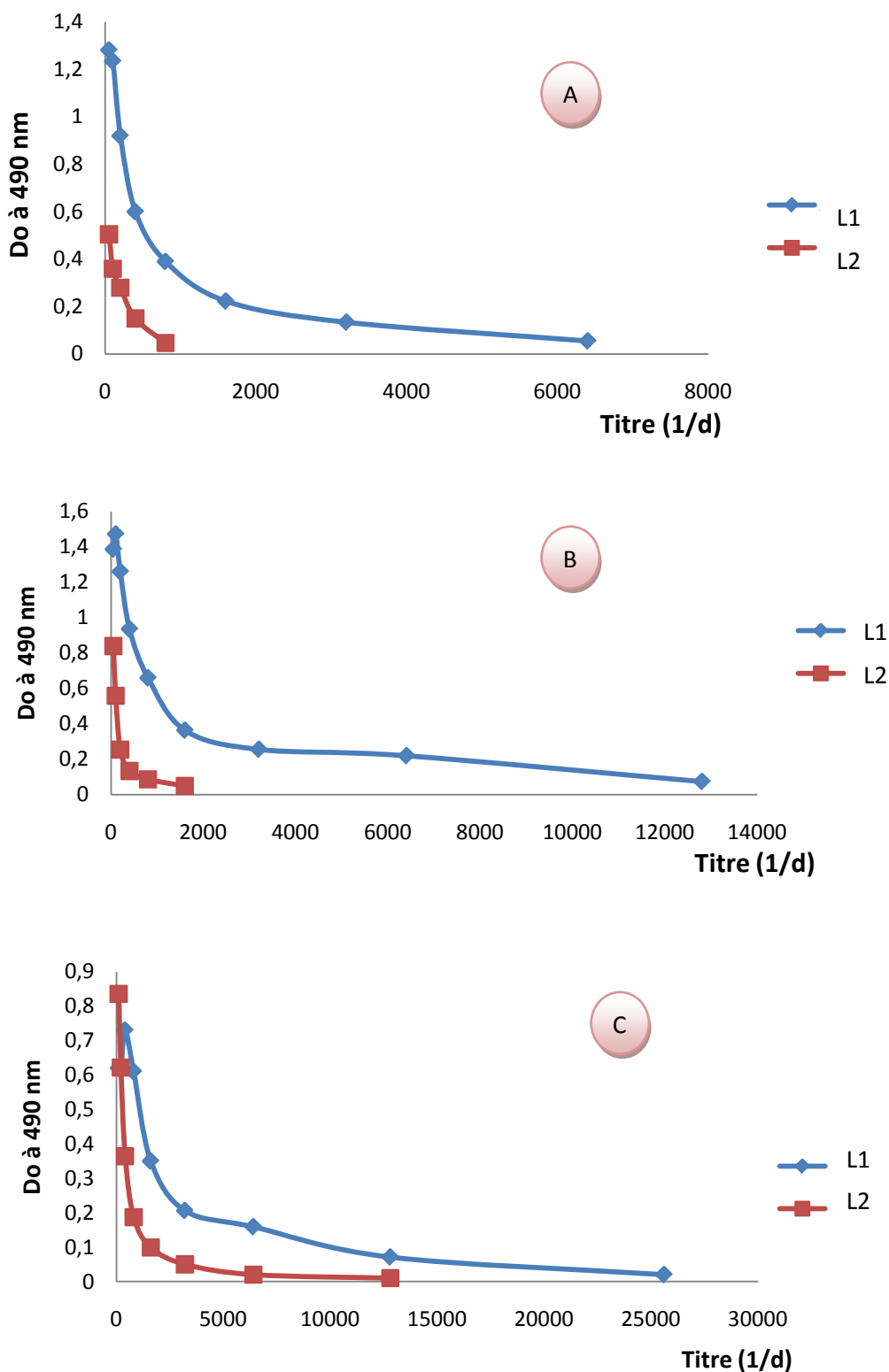


Figure 12 : Titre en anticorps spécifiques à la toxine Bot III testés par ELISA simple.

A: serum S₂, **B:** serum S₃, **C:** serum S₄.

Tableau IV : Titre en anticorps des immun-sérums en fonction du temps

	Lapin 1 (L1)	Lapin 2 (L2)
J₂₂ (S₂)	6400	800
J₂₉ (S₃)	12800	1600
J₃₆ (S₄)	25600	12800

Tableau V : Caractéristiques des deux immun-sérums après précipitation

Lapin	L1	L2
Paramètres		
Titre	12800	6400
UDO/ml	30	34.6
Concentration (mg/ml)	21.42	24.71

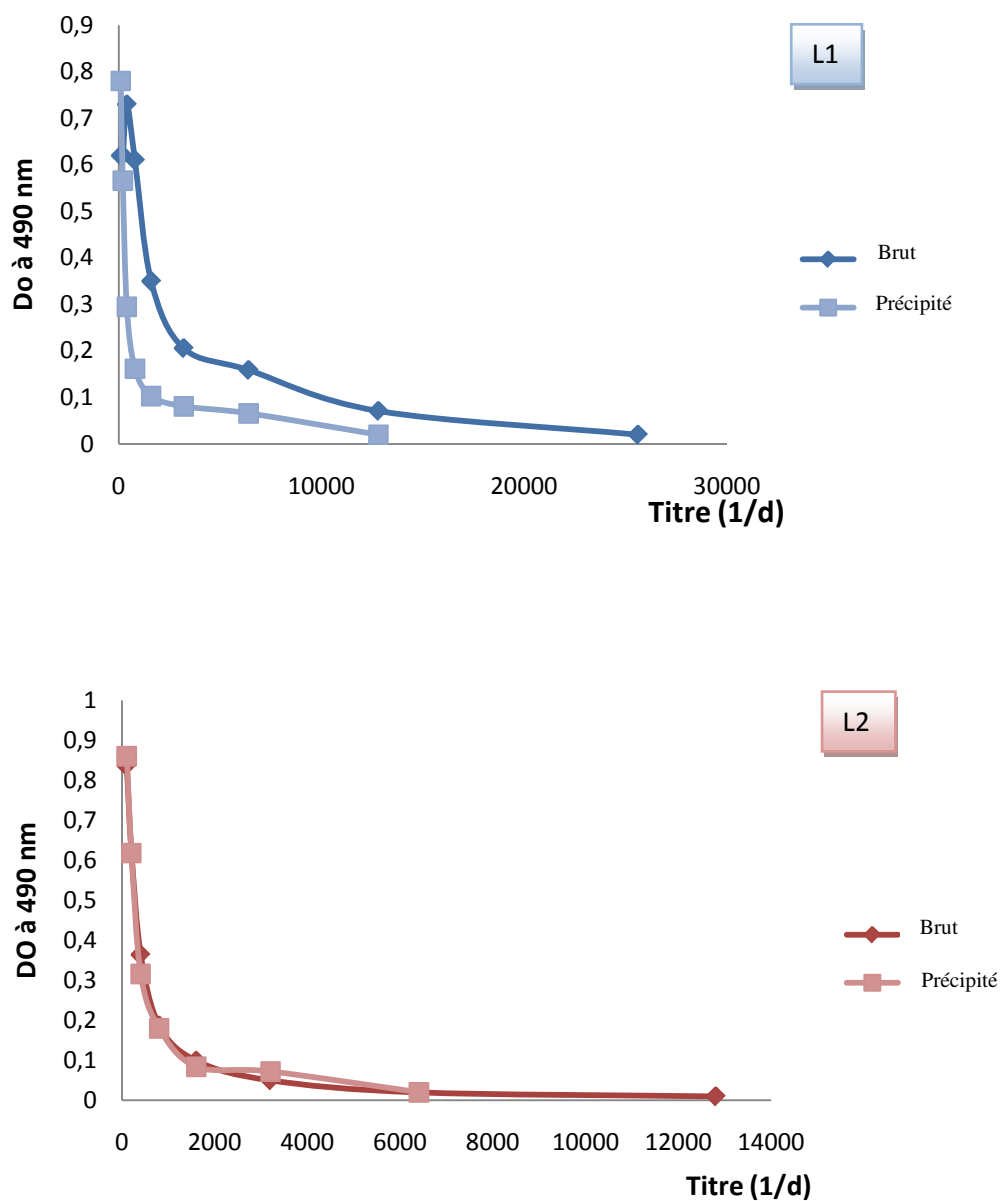


Figure 13 : Comparaison entre le titre de l'immun sérum brut et précipité par ELISA simple.

II. Etude de la biodistribution et quantification de la toxine Bot III

Dans le but d'étudier la biodistribution de la toxine Bot III et sa quantification dans le sérum et les différents organes (cœur, poumon et foie), des rats ont été injectés par une dose sublétales de la toxine Bot III par voie sous-cutanée puis ils ont été sacrifiés après 15, 30, 60, 120, 180 et 1440 minutes après injection.

Les sérums et les surnageants de broyats d'organes récupérés après centrifugation ont été testés par la technique ELISA sandwich.

Les concentrations de toxine au niveau du sérum et des organes (cœur, poumon et foie) sont déterminées à partir d'une courbe standard obtenue en diluant la toxine Bot III dans du tampon PBS. Cette courbe de concentration croissante, allant de 0.5 ng/ml à 6 ng/ml a donné une bonne corrélation avec un coefficient de linéarité égale à 0.963 (Figure 14).

Les concentrations de la toxine Bot III obtenues après quantification par le test ELISA sandwich au niveau des échantillons préparés sont illustrées au niveau du tableau VI.

Une concentration élevée de la toxine Bot III a été observée dans les sérums des animaux peu de temps après envenimation, entre 15 et 30 min le taux de la toxine atteint les 5 ng/ml. L'élimination de la toxine est rapide et commence après 2 heures d'injection, c'est là où sa concentration sérique commence à diminuer, à 24 h la toxine devient quasiment indétectable au niveau sérique avec une concentration de 0,076 ng/ml. Ces résultats indiquent que l'absorption et la distribution de la toxine Bot III du site d'injection vers le compartiment sanguin ainsi que son élimination sont très rapides (Figure 15).

Au niveau des organes, il a été remarqué que le pic de concentration de la toxine Bot III est atteint après 30 min d'envenimation. Cette concentration commence à diminuer après une heure, cette diminution devient importante après deux heures jusqu'à ce qu'elle devienne très faible après 24 heures. Le cœur fixe une concentration élevée de toxine qui peut atteindre les 5 ng/ml ($\pm 0,15$) par comparaison au foie qui a fixé une concentration maximale de 3 ng/ml ($\pm 0,44$), le poumon a fixé une concentration de 4 ng/ml ($\pm 0,24$) (Figure 15, Figure 16).

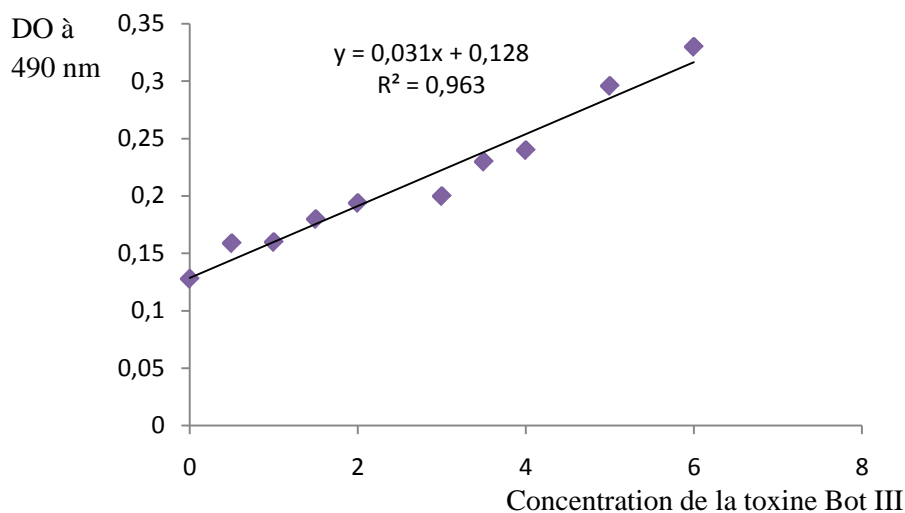


Figure 14 : Courbe standard du dosage de la toxine Bot III.

Tableau VI : Concentrations des toxines Bot III (ng/ml) dans les échantillons testés par ELISA sandwich.

Échantillon Temps (min)	sérum	Cœur	Poumon	Foie
15	5,35 ($\pm 0,084$)	3,98 ($\pm 0,33$)	3,88 ($\pm 0,29$)	2,31 ($\pm 0,091$)
30	5,77 ($\pm 0,22$)	5,3 ($\pm 0,15$)	4,2 ($\pm 0,24$)	3,43 ($\pm 0,44$)
60	4,9 ($\pm 0,55$)	4,44 ($\pm 0,091$)	3,51 ($\pm 0,26$)	2,14 ($\pm 0,07$)
120	2,86 ($\pm 0,27$)	3,88 ($\pm 0,20$)	3,06 (± 0)	1,49 ($\pm 0,12$)
180	1,18 ($\pm 0,17$)	1,81 ($\pm 0,43$)	0,82 ($\pm 0,29$)	0,62 ($\pm 0,063$)
1440	0,076 ($\pm 0,062$)	0,096 ($\pm 0,045$)	0,08 ($\pm 0,068$)	0,076 ($\pm 0,062$)

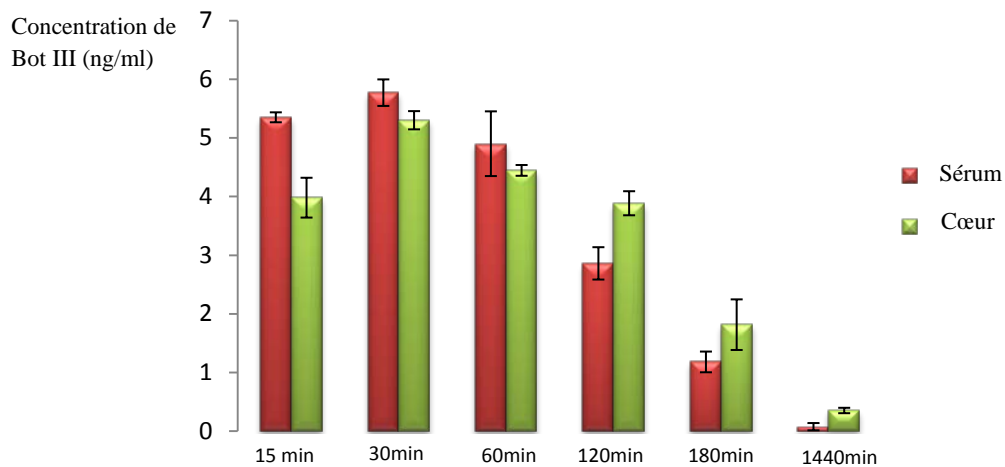


Figure 15 : Evolution du taux de la toxine Bot III dans le sérum et le cœur.

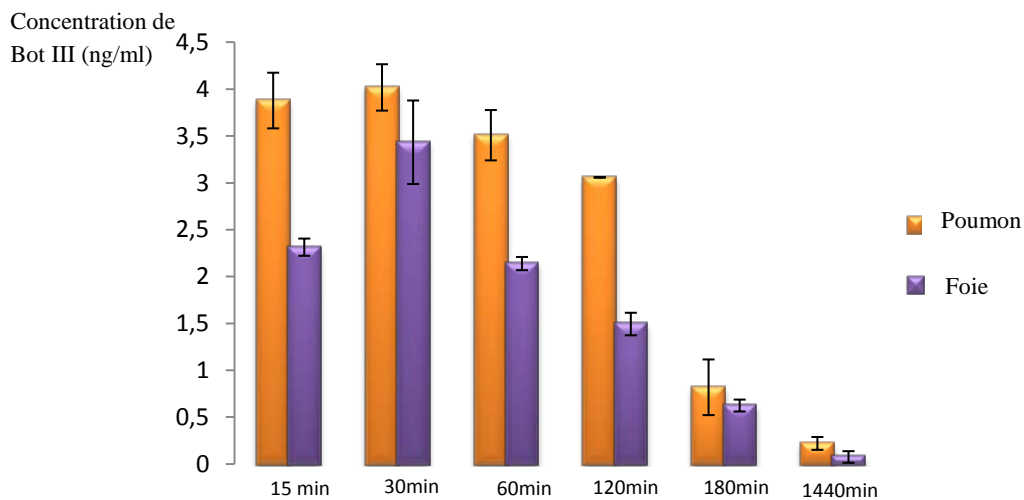


Figure 16 : Evolution du taux de la toxine Bot III dans le poumon et le foie.

III. Etudes des altérations tissulaires provoquées par la toxine Bot III au niveau des organes ; poumon, cœur et foie

Afin de mettre en évidence les altérations tissulaires provoquées par la toxine Bot III purifiée sur les organes : poumon, cœur et foie, des rats ont reçu une dose sublétales de cette toxine par voie sous-cutanée puis ils ont été sacrifiés 30 min, 3 et 24h après injection. Par la même voie les rats témoins ont reçu du NaCl 0,9%.

III.1. Effets de la toxine Bot III sur le parenchyme pulmonaire

Les coupes histologiques des poumons des rats témoins qui ont reçu de l'eau physiologique montrent une structure normale ; le parenchyme pulmonaire est constitué d'alvéoles séparés les uns des autres par des cloisons intra-alvéolaires contenant des pneumocytes et des capillaires sanguins.

Les coupes histologiques des poumons des rats ayant reçu une dose sublétales de la toxine Bot III et sacrifié après 30 minutes 3 et 24 heures montrent une désorganisation du parenchyme pulmonaire qui se manifeste par un épaississement des cloisons intra- alvéolaires avec des zones hémorragiques au niveau des alvéoles et au niveau de l'acinus glandulaire ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires. Les coupes montrent également la présence de zones œdémateuses.

Ces altérations sont toujours persistantes après 24 heures d'envenimation, Le parenchyme pulmonaire est désorganisé et les hémorragies et l'œdème sont persistants. Cependant l'infiltration des cellules inflammatoires est plus apparente après 30 min et 3h d'envenimation qu'après 24h (Figure 17).

III.2. Effets de la toxine Bot III sur le myocarde

Les coupes histologiques des rats témoins montrent une structure cardiaque normale.

L'étude histologique du cœur après envenimation avec une dose sublétales de la toxine Bot III par voie sous-cutanée montre des zones hémorragiques, présence d'œdème interstitiel ainsi qu'une hypertrophie des fibres cardiaques. Après 3 heures d'envenimation ces altérations sont plus intenses avec infiltration de cellules inflammatoires (Figure 18).

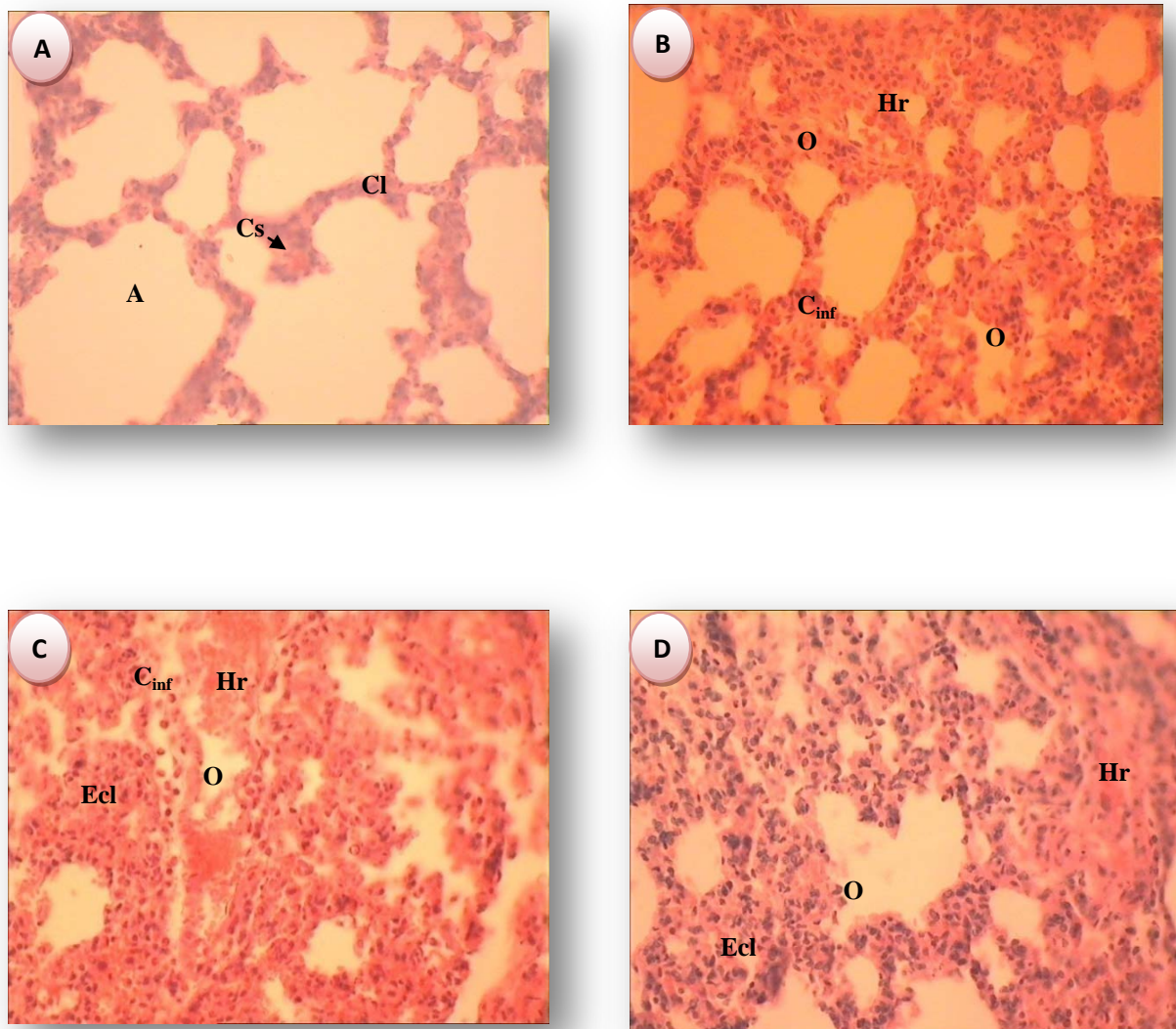


Figure 17 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le parenchyme pulmonaire après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h. Coloration H.E. Obj $\times 40$.

A : Témoin, **B :** Après 30 min, **C :** Après 3 h, **D :** Après 24 h.

A : Alvéole. **CI :** Cloison intra-alvéolaire. **Cs :** Capillaire sanguin
C_{inf} : Cellules inflammatoires. **Ecl :** Épaississement de cloison intra-alvéolaire.
O : Œdème. **Hr :** Hémorragie.

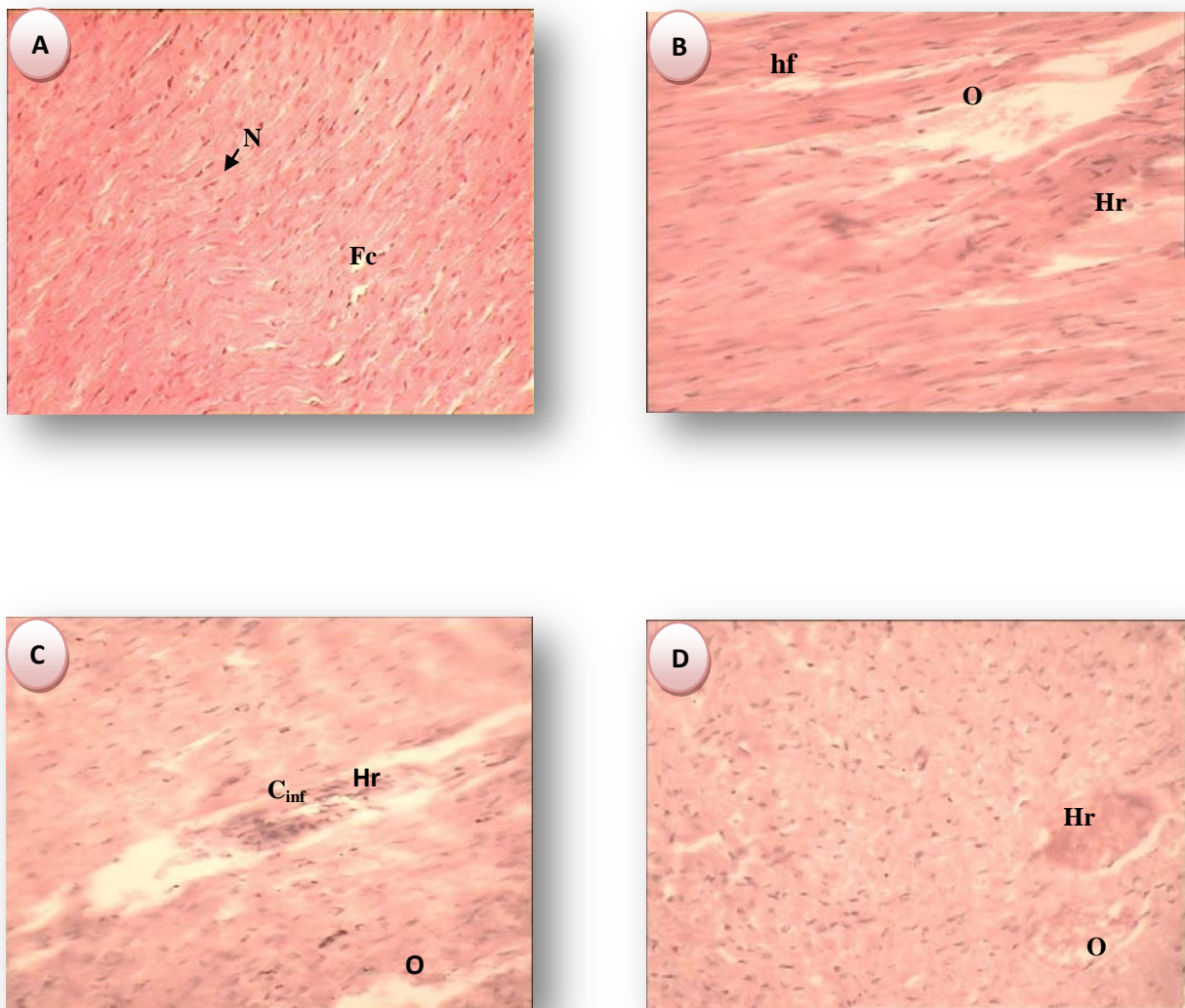


Figure 18 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le myocarde après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h.

Coloration H.E. Obj ×40.

A : Témoin, **B** : Après 30 min, **C** : Après 3 h, **D** : Après 24 h.

N : Noyau. **Fc** : Fibre cardiaque. **Hr** : Hémorragie. **hf** : hypertrophie des fibres cardiaque. **C_{inf}** : Cellules inflammatoires, **O**: Œdème

Après 24 h d'envenimation l'œdème et l'hémorragie sont toujours présents. Cette toxicité cardiaque est due à la liaison directe de la toxine Bot III aux canaux sodiques voltage-dépendants des cellules myocardiaques.

III.3. Effets de la toxine Bot III sur le parenchyme hépatique

Le parenchyme hépatique des rats témoins présente un aspect normal ; il est constitué de cellules disposées en travées orienté de manière radiaire autour de la veine centrolobulaire. Les hépatocytes sont des cellules mono ou binucléés, entre eux se profilent des espaces sinusoidaux, ou se trouvent les cellules de Kupffer.

L'analyse histologique du parenchyme hépatique des rats ayant reçus une injection sous cutanée d'une dose sublétale de la toxine Bot III révèle des modifications structurales qui consistent en une congestion de la veine centrolobulaire avec infiltration de cellules inflammatoires apparente beaucoup plus après 3 et 24h d'envenimation ainsi que la présence de zones hémorragiques. Des altérations sont également observées au niveau des structures de noyaux qui sont hypertrophiés. Des zones œdémateuses ont été également observées ainsi qu'une dilatation des espaces sinusoidaux (Figure 19).

IV. Effets de l'immunothérapie sur les altérations tissulaires induites par la toxine Bot III

IV.1. Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot III

L'administration de l'immun-sérum spécifique à la toxine Bot III avec une dose de 40 mg/ kg du poids corporel de l'animal par voie intrapéritonéale 30 minutes après l'injection d'une dose sublétale de la toxine Bot III par voie sous cutanée que l'immun-sérum réduisait les effets histopathologiques au niveau des organes poumon, cœur et foie (Figure 20).

Au niveau du cœur, la structure du myocarde paraît bien organisée et ressemble à celle du témoin avec absence d'hémorragie et d'infiltration de cellules inflammatoires. Néanmoins, des zones œdémateuses sont toujours présentes mais elles sont réduites par rapport à celles ou les rats n'ont pas eu d'immunothérapie.

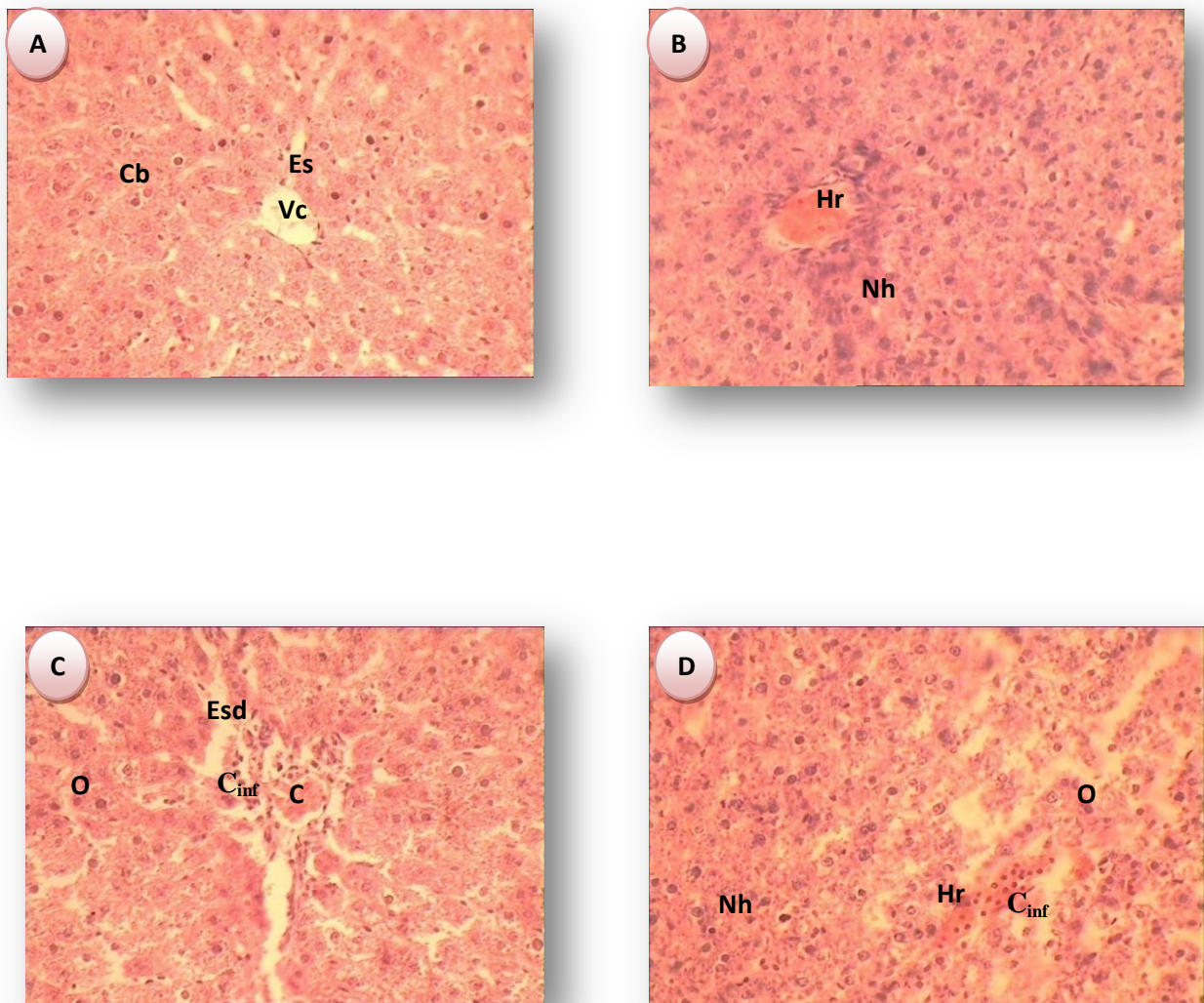


Figure 19 : Effets histopathologiques d'une dose sublétales de la toxine Bot III sur le parenchyme hépatique après injection en s.c à des rats sacrifiés après 30 min, 3 h et 24 h. Coloration H.E. Obj $\times 40$.

A : Témoin, **B :** Après 30 min, **C :** Après 3 h, **D :** Après 24 h.

Cb : cellules binucléées. **Es :** espace sinusoidale. **Vc :** veine centrolobulaire. **C :** Congestion.
C_{inf} : cellules inflammatoires. **Nh :** noyaux hypertrophiées. **Hr :** hémorragie.
O : Œdème. **Esd :** espace sinusoidale dilaté

Il est à noter qu'au niveau du poumon, l'hémorragie a été neutralisée et que l'œdème pulmonaire a été réduit en présence d'immun-sérum spécifique à Bot III. Cependant nous avons remarqué une persistance d'épaississement des parois intra-alvéolaires.

Au niveau du foie nous remarquons que la structure du parenchyme hépatique des rats ayant reçu l'immun-sérum après envenimation est semblable à celle du témoin. L'hémorragie est quasiment absente, il en est de même pour l'infiltration des cellules inflammatoires. L'œdème est toujours présent mais plus réduit que celui observé chez les rats n'ayant pas reçu d'immun-sérum.

Les coupes histologiques des différents organes cœur, poumon et foie des rats ayant reçu l'immun-sérum spécifique après 30 minutes d'envenimation par la toxine Bot III montrent que les anticorps présents ont effectué une neutralisation partielle des effets histopathologiques induits par cette toxine.

IV.2. Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot

L'administration de l'immun sérum spécifique au venin Bot à raison de 40 mg/ kg du poids de l'animal par voie i.p. 30 minutes après l'injection sous-cutanée d'une dose sublétales de la toxine Bot III a montré que les effets histopathologiques sont persistants mais moins intenses (Figure 21).

L'hémorragie, l'œdème et l'épaississement des parois intra-alvéolaires sont persistants au niveau du parenchyme pulmonaire, au niveau du myocarde, l'œdème avec une infiltration de cellules inflammatoires est observé. Les espaces sinusoidaux sont dilatés et il y a apparition de la congestion au niveau du parenchyme hépatique.

Par comparaison avec l'effet de l'anti-toxine Bot III, nous remarquons que l'immun-sérum spécifique à Bot III est plus efficace dans la neutralisation des lésions tissulaires induites par la toxine Bot III.

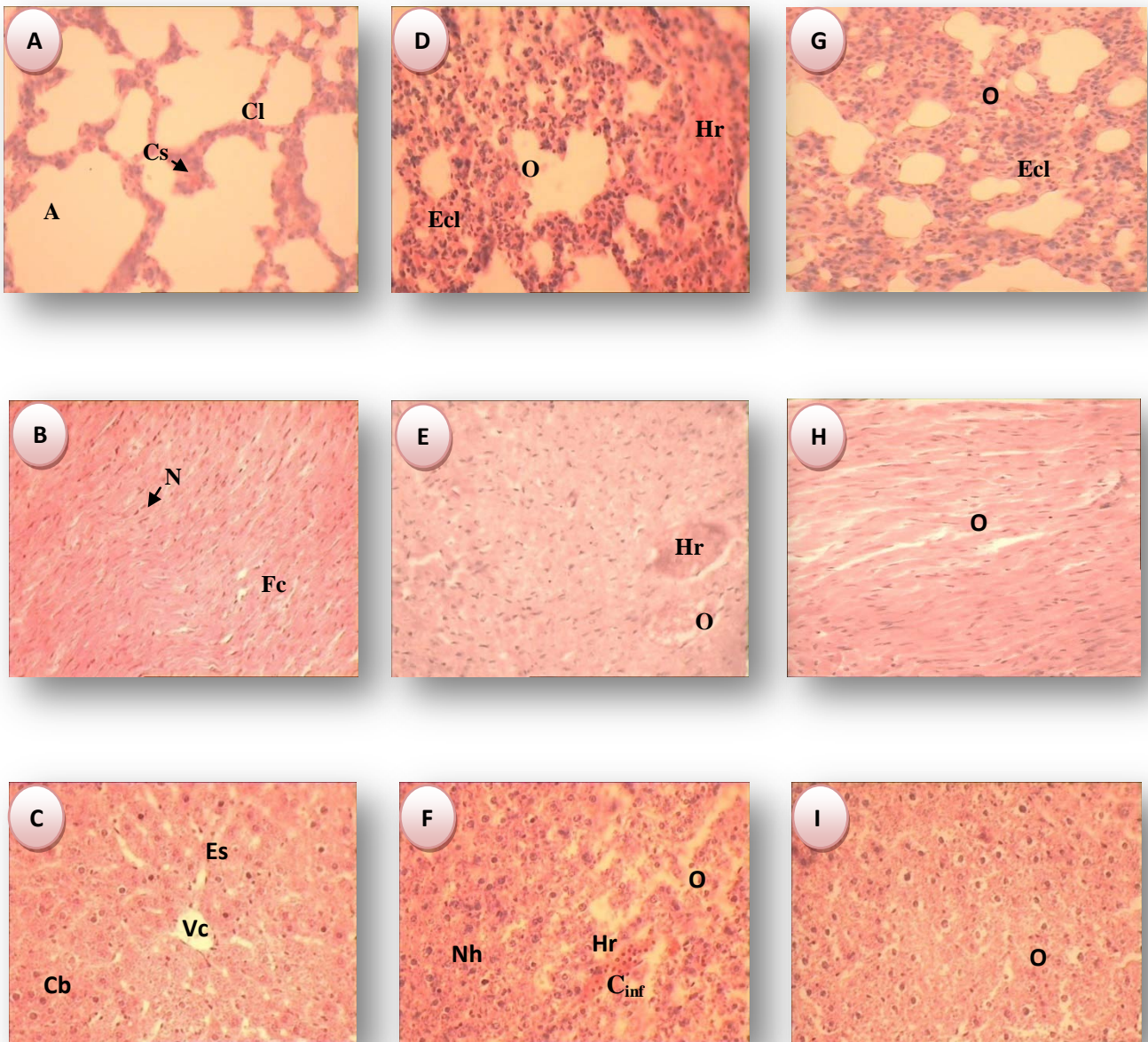


Figure 20 : Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot III sur les altérations tissulaires induites par la toxine Bot III. Coloration H.E. Obj $\times 40$.

A, B, C : témoins poumon, cœur et foie. **D, E, F :** poumon, cœur et foie en présence de toxine Bot III (après 24 h). **G, H, I :** poumon, cœur et foie en présences de toxine Bot III et d'immun-sérum spécifique à Bot III

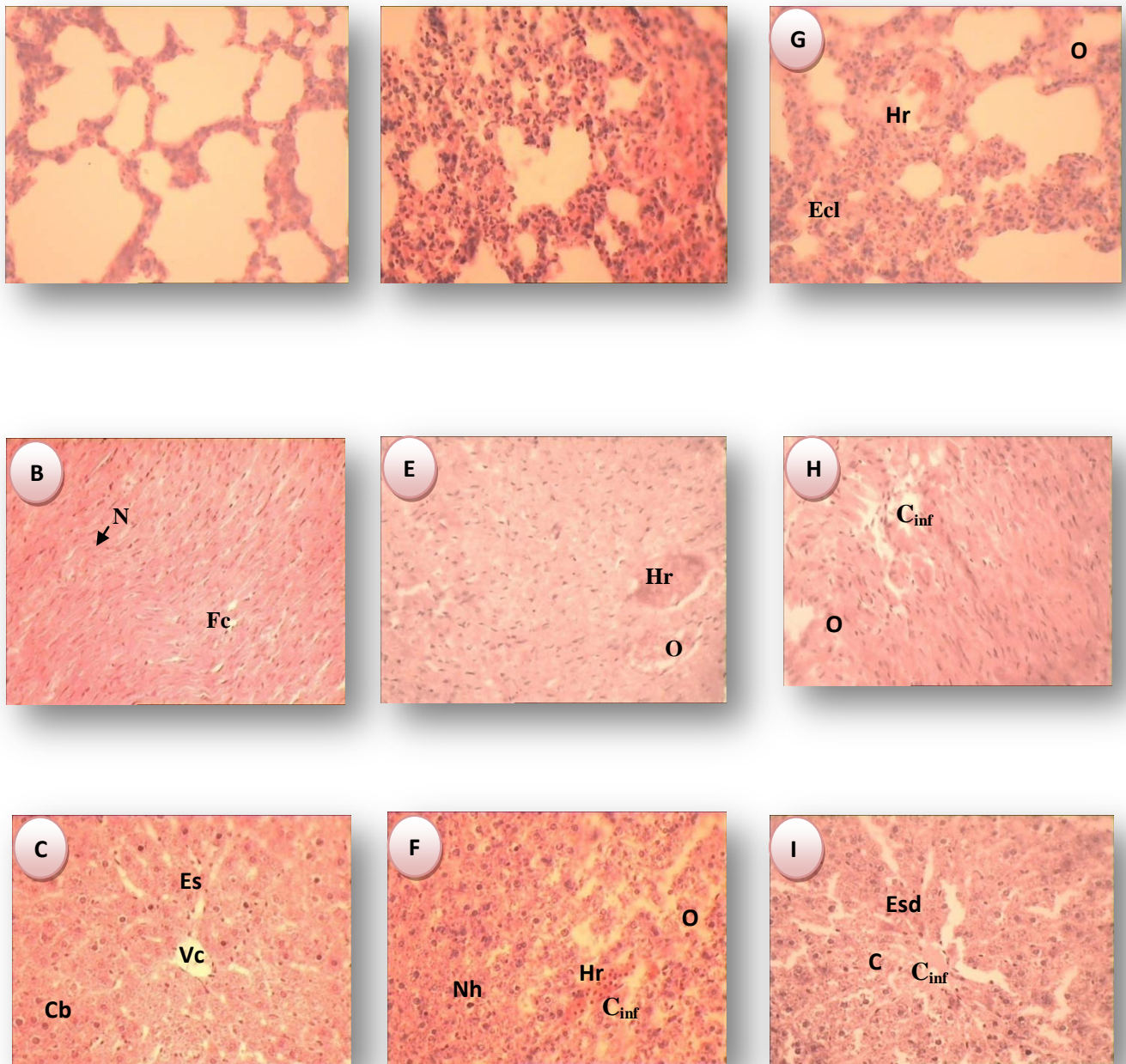


Figure 21 : Effets de l'immun-sérum spécifique à Bot sur les altérations tissulaires induites par Bot III. Coloration H.E. Obj $\times 40$.

A, B, C : témoins poumon, cœur et foie. **D, E, F :** poumon, cœur et foie en présence de toxine Bot III (après 24 h). **G, H, I :** poumon, cœur et foie en présences de toxine Bot III et d'immun-sérum spécifique à Bot.

Discussion générale

Afin d'étudier la biodistribution de la toxine Bot III, des anticorps spécifiques à cette toxine ont été produits après immunisation de deux lapins par des injections sous-cutanée de la toxine Bot III. A la fin de l'immunisation, Le titre en anticorps des deux lapins est différent ; le lapin 1 a donné un titre plus élevé que celui du lapin 2. Ceci est du aux différences très marquées qui existent dans la réponse de chaque individu à l'injection, dans les conditions identiques, d'un même antigène. Il existe donc de bons et de mauvais producteurs d'anticorps (Letonturier, 1998).

L'étude de la distribution du venin total ou celle des toxines purifiées permet une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'envenimation scorpionique, spécialement par la détermination du taux de venin et de toxine au niveau du sérum et des tissus. Pour cela des techniques immunoenzymatiques ont été mises au point afin de quantifier le venin lors d'une envenimation ophidienne et scorpionique. Nous avons opté pour le test ELISA sandwich dans le but d'étudier la distribution de la toxine Bot III et de déterminer sa concentration au niveau du sérum et des tissus (cœur, poumon et foie) chez un model expérimental.

La technique ELISA a été largement utilisée en clinique et dans l'étude expérimentale pour la quantification du venin et de l'anti-venin, compte tenu sa facilité de manipulation. Son utilisation est recommandée car elle n'implique pas l'utilisation de matériels radioactifs (Theakston, 1983; Ho et *al.*, 1986; Chavez-Olortegui et *al.*, 1993).

L'application du test ELISA sandwich dans la quantification et l'étude de la distribution de la toxine Bot III chez les rats envenimés par une dose sublétales de cette toxine par voie sous-cutanée a montré que la toxine Bot III présente une cinétique très rapide, elle apparait dans le sang après un temps court de l'injection (15 min). Le pic de concentration est atteint après 30 min d'envenimation pour le sérum et les différents organes étudiés. A partir de 2 h ce taux commence à diminuer et à 24 h la toxine devient indétectable. La concentration de la toxine est élevée dans le cœur vu la liaison direct de la neurotoxine au niveau des cellules du myocarde. Ces résultats suggèrent une absorption, une distribution rapide du site d'injection vers le compartiment sanguin et tissulaire.

Discussion générale

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux obtenus lors d'une étude de la biodistribution des trois neurotoxines qui composent le venin de scorpion *Androctonus australis Hector* ; AahI, Aah II et Aah III après leur injection en tant qu'extrait aqueux par voies sous-cutanée à des lapins. Ces trois toxines apparaissent dans le plasma après un temps court d'injection et leurs taux dans le plasma diminuent rapidement. La concentration maximale d'Aah I mesurée à 2 ng/ml est observée après 43 ± 11 min, celle d'Aah II atteint les 3 ng/ml après 26 ± 10 min et Aah III est atteinte après 49 ± 10 min. Le taux des trois toxines diminue rapidement dans le plasma et devient indétectable après 1440 min. la toxine Aah II devient indétectable après 180 min (Devaux et al., 2004).

Ceci confirme que les toxines apparaissent rapidement dans le plasma après injection sous-cutanée comme il a été décrit pour le venin total cependant les toxines s'éliminent plus rapidement que d'autres composés du venin. L'apparition précoce des toxines dans le plasma est en accord avec le temps d'apparition de la majorité des symptômes cliniques c'est-à-dire entre 5 et 20 min d'envenimation. Ainsi la sérothérapie doit être administrée immédiatement pour prévenir la liaison de la toxine à sa cible (Krifi et al., 1998).

La biodistribution a été également étudiée pour le venin total. Revelo et ses collaborateurs (1996) ont utilisé le test ELISA pour l'étude de la distribution du venin de *Tityus serrulatus* après son injection par voie s.c à des souris et ont montré que le venin est absorbé avec un temps maximal de 2 heures de son site d'injection, la concentration maximale du venin est atteinte après 30 min dans le sérum et les différents organes étudiés (cœur, poumon, foie, rein et cerveau) et son élimination se fait après 8 heures d'injection.

Une concentration maximale du venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus* est détectée entre 30 et 60 min après injection d'une dose de 75 mg/kg chez les lapins par voie i.v. (Krifi et al., 2001). Hammoudi-Triki et ses collaborateurs (2007) ont appliqué le test ELISA pour mettre en évidence la toxicocinétique du venin de scorpion et ont montré que l'absorption précoce du venin consiste en l'apparition rapide des symptômes cliniques après envenimation chez un modèle expérimental de rats.

En outre, la biodistribution a été étudiée par le test RIA. Ismail et ses collaborateurs (1980) ont détecté une forte concentration du venin d'*Androctonus amoreuxi* marqué à l' I^{125} après 5 min de son injection par voie i.v à des lapins.

Discussion générale

Ces mêmes résultats ont été observés lors de l'étude de Murugesan et ses collaborateurs (1999) réalisée sur des lapins injectés par voie i.v. du venin de scorpion *Mesobuthus tamulus concanensis* Pocock.

Le test ELISA permet la quantification des toxines ou de venin libre seulement, cette méthode ne peut pas mesurer les toxines complexées avec les anticorps, cependant la radioactivité permet la quantification des toxines totales, libres ou liées aux anticorps (Hammoudi-Triki et al., 2007). Le radio-marquage marque toutes les molécules du venin du même degré donc il détecte même les molécules du venin dégradées ou neutralisées.

La toxine Bot III a une distribution analogue à celle des toxines Aah I et Aah II, cependant elle n'est pas identique à celle mesurée par le test ELISA après injection des venins de *Buthus occitanus tunetanus* (Krifi et al., 2002) *Tituys serrulatus* (Revelo et al., 1996) *Androctonus australis hector* (Hammoudi-Triki et al., 2007) et *Androctonus mauritanicus mauritanicus* (El Hafney et al., 2002). Donc la pharmacocinétique du venin total diffère de celle des toxines purifiées. Les toxines disparaissent du plasma plus rapidement, ce qui indique que l'immunothérapie doit être administrée en urgence pour les victimes appartenant au grade III et si c'est possible pour les patients appartenant au grade II pour prévenir la progression des symptômes vers le grade III, étant donné que les patients peuvent progresser du grade II en grade III entre 2h et 4h de l'envenimation, à ce moment les toxines disparaissent du sang (Krifi et al., 2002).

Le but d'utiliser une immunothérapie spécifique à une toxine est de neutraliser la toxicité du venin total. Selon Devaux et ses collaborateurs (2002), la neutralisation de la toxine Aah II seulement pourrait diminuer la toxicité du venin total de 42 à 84%, le taux de mortalité des victimes étant de 0,1 à 0,2%, si la toxicité du venin est neutralisée de 42 à 84% le décès de ces victimes pourrait être évité.

L'étude de la distribution et la quantification de la toxine Bot III a été complétée par une étude histologique des organes ; cœur, poumon et foie. L'administration d'une dose sublétales de la toxine par voie sous cutanée a montré des lésions tissulaires au niveau des trois organes étudiés.

Discussion générale

Au niveau du cœur nous avons observé la présence d'hémorragie, œdème, ainsi qu'une hypertrophie des fibres cardiaques, une altération au niveau des noyaux a été observée (pycnose ou caryolyse) et une infiltration des cellules inflammatoires au niveau des tissus observés après 3h d'envenimation.

Des lésions similaires (hémorragie, œdème et caryolyse) ont été observées après injection du venin d'Aah, sa fraction toxique et sa toxine Aah II par voie intra-péritonéale ou après injection du venin d'Aah par voie s.c (Sami-Merah et *al.*, 2008; Adi-Bessalem et *al.*, 2008).

Il a été constaté que les venins de scorpion présentent un effet direct sur les fibres musculaires cardiaques et induisent leur épaissement. Cette toxicité cardiaque est due à la liaison directe des neurotoxines avec les canaux ioniques des cellules cardiaques (Ghazal, 1975 ; Ismail, 1980).

En outre, il été démontré que la toxicité cardiaque est causée par la libération des neuromédiateurs cholinergiques et adrénrgiques par le système nerveux sympathique et parasympathique suite à une liaison des toxines de scorpion aux canaux ioniques voltage dépendant (Gueron et Yarom, 1970; Freire-Maïa et *al.*, 1983; Ismail et *al.*, 1995; Mazzei De Davila et *al.*, 2002).

L'injection d'une dose sublétales des venins de *Tityus serrulatus* et celui de *Tityus trinitatis* à des rats présente les mêmes lésions tissulaires avec hémorragie et œdème (Corréa et *al.*, 1997; Daisley et *al.*, 1999).

Des auteurs rapportent que les neurotoxines des venins de scorpions se lient directement aux canaux sodiques voltage dépendant des cellules neuronales et des cellules musculaires et affectent leurs membranes en entraînant une modification du potentiel d'action et par conséquence, il y a une libération massive de neurotransmetteurs, tel que les catécholamines et l'acétylcholine responsable notamment des dysfonctionnements cardiaques et pulmonaires (Gueron et Yarom, 1970; Freire-Maïa et *al.*, 1983; Ismail et *al.*, 1995; Mazzei De Davila et *al.*, 2002). Ceci expliquerait le taux élevé de la toxine Bot III détecté au niveau du cœur après dosage par le test ELISA sandwich.

Au niveau du parenchyme pulmonaire, les coupes histologiques ont montré une désorganisation du parenchyme pulmonaire qui se manifeste par un épaissement des cloisons intra- alvéolaire, des hémorragies, une infiltration de cellules inflammatoires, ainsi que des zones œdémateuses.

Des lésions similaires ont été observées après injection du venin total d'Aah par voie sous cutanée, ou celle de sa fraction toxique ($F_{tox}G_{50}$) et de sa toxine la plus active Aah II par voie intra-péritonéale (Adi-Bessalem et al., 2003; Sami-Merah et al., 2008). Des lésions du parenchyme pulmonaire ont été également observées après injection d'autres venins. Bertke et Atkins (1961) ont montré que le venin de *Centroroïdes Sculpturatus* induit ces mêmes lésions. L'hémorragie et l'œdème intra-alvéolaire ont été observés après injection du venin de *Leiurus quinquestriatus* à des souris (El Asmar et al., 1972).

Une dilatation des parois alvéolaires, œdème pulmonaire accompagnée par une infiltration des leucocytes des poumons de lapin et du bélier ont été observées après envenimation par le venin de *Tityus discrèpans* (D'Suze et al., 2004, 2007). Ces mêmes lésions ont été observées après injection du venin de *Tityus serrulatus* ou sa fraction toxique, Ces altérations seraient responsables de l'augmentation de la perméabilité membranaire ainsi que de l'infiltration cellulaire (De Matos et al., 2001).

L'œdème pulmonaire est une complication majeure observée chez les personnes piquées par un scorpion. Il est généralement la principale cause de la majorité des cas de décès après envenimation. L'œdème pulmonaire peut être induit par deux mécanismes : 1) Un facteur cardiogénique relié directement à un dysfonctionnement du ventricule gauche, ce dysfonctionnement est causé par la libération massive des catécholamines ou par des lésions de myocarde suite à la liaison de neurotoxines (Mazzei De Davila et al., 2002; Zeghal et al., 2000). 2) Un facteur non cardiogénique qui pourrait être le résultat d'une augmentation de la perméabilité vasculaire du poumon suite à une libération massive des médiateurs inflammatoires (Amaral et al., 1994; Gueron et al., 1996; Freire-Maïa et De Matos, 1993).

Des études ont montré que l'œdème pulmonaire chez le rat induit par le venin de *Tityus serrulatus* est dû à l'activation de la cascade inflammatoire et la libération des médiateurs lipidiques de l'inflammation notamment le PAF, les leucotriènes et les prostaglandines (De Matos et al., 1997, 1999).

Au niveau du parenchyme hépatique la toxine Bot III a induit des modifications structurales qui consistent en une congestion de la veine centrolobulaire avec infiltration de cellules inflammatoires, hémorragie et caryolyse. Des zones œdémateuses ont été également observées ainsi qu'une dilatation des espaces sinusoidaux.

Discussion générale

Des changements histopathologiques similaires ont été observés au niveau du foie après injection du venin d'Aah à des souris (Adi-Bessalem *et al.*, 2003). La congestion et l'hémorragie ont été observées après injection du venin de *Tityus serrulatus* et sa principale neurotoxine TsTX-I (Corréa *et al.*, 1997).

L'altération des noyaux des hépatocytes (pynose et caryolyse) est également observée dans la plupart des envenimations scorpioniques. La pynose des noyaux est souvent le résultat d'une condensation de la chromatine qui se colore intensément avec les colorants basiques comme l'hématoxyline. La caryolyse serait due à une désintégration de la chromatine qui ne présente aucune coloration quelque soit le colorant utilisé (Cabane et Bonenfant, 1980).

Nous avons constaté que les altérations au niveau du parenchyme hépatique étaient très marquées même si le test ELISA sandwich a révélé que le foie a fixé un taux très faible de toxine Bot III .ceci pourrait être expliqué par le fait que le venin de scorpion et ses toxines induisent leurs effets indirectement sur le foie, par la libération accrue des neurotransmetteurs au niveau des synapses.

L'ensemble des altérations histologiques observées serait du au fait que la toxine Bot III soit une α neurotoxine qui se lie au site 3 du canal sodique voltage dépendant et bloque ainsi son inactivation. Cette inactivation se traduit par une hyperexcitabilité du système nerveux et une libération accrue de neuromédiateurs, tel que les catécholamines et l'acétylcholine. Les lésions tissulaires observées après injection de la toxine Bot III pourraient être reliées au taux élevés des catécholamines circulants après action directe de la toxine sur le système nerveux.

La congestion et l'hémorragie observées au niveau des organes étudiés pourraient être générées du fait que la toxine cause l'augmentation du flux cellulaire des ions Ca^{2+} , c'est ce qui va induire l'activation des PL responsables de l'hydrolyse des membranes cellulaires.

L'immunothérapie reste à l'heure actuelle le seul traitement spécifique contre l'envenimation scorpionique, cependant son efficacité dépend de plusieurs paramètres ; la dose, la voie et le délai d'administration, la qualité et la capacité neutralisante des anticorps.

Nous avons observé que l'administration de l'immun-sérum spécifique à Bot III par voie i.p 30 min après injection s.c de la toxine Bot III réduisait les lésions tissulaires induites par cette toxine. Donc l'immun-sérum assure une neutralisation partielle des effets histopathologiques de la toxine Bot III.

Discussion générale

Dans notre étude, la neutralisation partielle provoquée par l'immun-sérum est probablement due à la différence de la pharmacocinétique de la toxine et celle de l'anticorps. La toxine ayant une masse moléculaire ne dépassant pas 7 kDa, sa distribution et son élimination sont très rapides, contrairement à l'anticorps qui possède une masse moléculaire de l'ordre de 150 kDa, sa distribution et son élimination seront par conséquent plus retardées.

La capacité neutralisante des fragments $F(ab)'_2$ anti $F_{tox}G_{50}$ de venin d'Aah administré par voie intra-péritonéale après injection d'une dose sublétales ou d'une DL_{50} du venin d'Aah sur les modifications histopathologiques des organes cœur, poumon et foie montrent une neutralisation de la quasi-totalité des perturbations tissulaires ; sans œdème ni hémorragie (Adi-Bessalem et *al.*, 2003).

Afin d'assurer une neutralisation totale des effets toxiques, l'utilisation de molécules neutralisantes de taille plus faible serait recommandée, comme c'est souvent le cas pour les fragments Fab. Ces fragments présentent cependant l'inconvénient d'être éliminés rapidement peut être même avant de se lier à la toxine et de la neutraliser. L'utilisation d'un mélange de deux types de fragments ($Fab/F(ab)'_2$) pourrait répondre à cet inconvénient. Pour cela, Sami-Merah et ses collaborateurs (2008) ont appliqué un traitement d'immunothérapie constitué d'une combinaison entre les fragments Fab'_2/Fab après l'administration du venin total d'Aah, la fraction toxique $F_{tox}G_{50}$ et la toxine Aah II. Cette combinaison s'est montrée efficace dans la neutralisation des lésions cardiaques et pulmonaires ainsi que dans la réduction de la migration cellulaire induite par le venin, sa fraction toxique et sa toxine la plus active. Le traitement avec une combinaison Fab'_2/Fab présente des effets neutralisants plus significatifs que d'autres types d'anticorps.

De Rezende et ses collaborateurs (1998) ont montré une réduction de manifestations cardiovasculaires des effets du venin et scorpion *Tityus Serrulatus* après administration de l'anti-venin chez les humains. Ces auteurs ont suggéré la capacité neutralisante des fragments Fab'_2 sur le venin circulant. Hamed (2003) a reporté que le taux de mortalité a été réduit chez les patients traités avec un antivenin spécifique après envenimation avec *Leirus quinquestriatus* ou *Androctonus crassicauda*.

Discussion générale

L'administration de l'immun-sérum spécifique au venin Bot après injection s.c de la toxine Bot III a montré une faible efficacité de neutralisation des lésions tissulaires induites par la toxine. Ceci est probablement du, non seulement, à la différence de pharmacocinétique entre la toxine et l'anticorps, mais aussi à la faible concentration des anticorps spécifiques à la toxine Bot III dans l'immun-sérum spécifique à Bot.

La toxine Bot III représente environ 0,08% des protéines totales du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, l'immun-sérum produit par immunisation des animaux par le venin de Bot contiendrait une faible concentration en anticorps spécifiques à la toxine.

Conclusion

Le travail que nous avons réalisé présente deux objectifs :

- l'étude de la biodistribution de la toxine Bot III et la détermination de sa concentration en fonction du temps dans les différents compartiments (sérum et organes) par application du test ELISA sandwich.
- l'analyse des effets histopathologiques causés par la toxine Bot III au niveau du myocarde, du foie et des poumons, en présence et en absence d'immun-sérum spécifique à la toxine Bot III ou au venin total Bot.

La réalisation de ce travail a été abordée suite à une envenimation expérimentale avec une injection d'une dose sublétales de la toxine Bot III.

Les résultats obtenus ont montré que la toxine Bot III présente une absorption, une distribution et une élimination très rapides. Ce qui fait de l'envenimation scorpionique un cas d'extrême urgence qui nécessite une prise en charge des patients envenimés dans les plus brefs délais, avec un traitement approprié qui suggère l'utilisation de petits fragments d'anticorps qui peuvent être éliminés après leur liaison aux toxines, associée à un traitement symptomatique.

Le test ELISA sandwich reste un outil de recherche très efficace pour l'étude de la biodistribution et la quantification des antigènes sériques. L'utilisation du test ELISA est également très fréquente en clinique afin de suivre l'évolution de l'état de l'envenimé.

L'analyse des effets histopathologiques a montré que la toxine Bot III est capable d'induire des altérations tissulaires telles que des œdèmes et des hémorragies au niveau des organes cœur, poumon et foie. Ces modifications seraient dues à la liaison directe de la toxine Bot III au canal sodique potentiel-dépendant ce qui va augmenter le taux des neurotransmetteurs qui vont à leur tour activer les phospholipases endogènes.

L'utilisation de l'immunothérapie spécifique à la toxine Bot III a montré que l'immun-sérum a neutralisé d'une manière partielle les altérations tissulaires au niveau du cœur, du poumon et du foie. Ceci serait dû à la différence des paramètres pharmacocinétiques entre la toxine et l'anticorps.

L'administration de l'immun-sérum spécifique au venin Bot après injection de la toxine Bot III a montré une faible efficacité dans la neutralisation des effets histopathologiques induites par la toxine. Ceci serait du, non seulement, à la différence de pharmacocinétique entre la toxine et l'anticorps, mais aussi à la faible teneur des anticorps spécifiques à la toxine Bot III dans l'immun-sérum spécifique au venin total.

Afin d'assurer une restauration efficace des lésions tissulaires et une neutralisation complète de la toxine, il est recommandé d'utiliser des fragments neutralisants de faible poids moléculaire (fragments Fab ou F(ab')₂) spécifiques à la toxine.

En perspectives :

- Mise au point d'un test ELISA rapide et son application afin de quantifier la toxine après immunothérapie.
- Réalisation d'une étude immunohistochimique dans le but de localiser la neurotoxine sur sa cible.
- Application de l'immunothérapie avec des fragments d'anticorps ; Fab et/ou F(ab')₂.

Références bibliographiques

-A-

- ❖ Abia, A., Lobaton, C.D., Moreno, A. et Garcia-Calvo, J. (1986) *Leiurus quinquestriatus* venom inhibits different kinds of Ca^{2+} dependent K^+ channels. *Biochem. Biophys. Acta.* **856**: 403-407.
- ❖ Abroug, F. (2002) Controverse au sujet de l'immunothérapie antiscorpionique : arguments cliniques défavorables. *Infotox N°15*, 7-9.
- ❖ Adams, M.E. et Olivera, B.M. (1994) Neurotoxins : Overview of an emerging research technology (Review). *TINS* **17**: 151-155.
- ❖ Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2003) Effet de 'immunothérapie sur les modifications métaboliques et histopathologiques après envenimation scorpionique expérimentale. *Bull Soc Pathol Exot* **96**:297–302.
- ❖ Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2008) Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom:Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology* **60**: 373–380.
- ❖ Ali, S.A., Wang, B., Alam, M., Beck, A., Stoeva, S., Voelter, W., Abbasi, A., Duszenko, M. (2006) Structure-activity relation-ship of alpha toxin Bs-Tx28 from scorpion (*Buthus indicus*) venom suggests a new alpha-toxin subfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**: 81-94.
- ❖ Armstrong, C.M. et Hille, B. (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability, *Neuron* **20**: 371-380.
- ❖ Amaral, C.S.F, Barbosa, AJA, Leite, VHR, Tafuri, WL., Rezende, AA. Scorpion sting-induced pulmonary oedema, evidence of alveolo capillary membrane permeability (1994) *Toxicon* **32**: 999–1003.

-B-

- ❖ Baden, D.G. (1989) Brevetoxine: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB.J.***3**: 1807-1817.
- ❖ Bach, J.F, Chatenoud L. (2002) *Immunologie*. Edition Medecine science Flammarion, p 180.
- ❖ Balozet, L., (1971) Scorpionism in the old world. In *Venomous animal and their venoms* (Bûcherl W. & Buckley E.E., eds), Vol. **III**: pp. 349-371. Academic Press New York.
- ❖ Benkhadir, K., Kharrat, R., Cestele, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M., Karoui, H. (2004) Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin Bot III: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependant sodium channels. *Peptides* **25**: 151-161.
- ❖ Bertke, E.M, Atkins, J.H. (1961) Effects of *Centruroides sculpturatus* venom upon rat tissues. A: histopathological study. *Toxicon* **2**:205–9.
- ❖ Borchani, L., Stankiewicz, M., Kopeyan, C., Mansuelle, P., Kherrat, R., Céstele, S., Karoui, H., Rochat, H., Pelhate, M., El Ayeb, M., (1997) Purification, structure and activity of three insect toxins from *Buthus occitanus tunetanus* venom. *Toxicon* **35**: 365-382.
- ❖ Borel, J.P., Marquart, F.X., Gillery Ph., Exposito, M. (1999) *Biochimie pour le clinicien. Mécanisme moléculaires et cliniques à l'origine des maladies*. Edition Frison-Roche.
- ❖ Bosmans, F. et Tytgat, J. (2006). Voltage-gated sodium channel modulation by alpha-toxins. *Toxicon* **49**: 142-158.
- ❖ Bougis, P.E., Rochat, H., Smith, L.A., (1989) Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structure of precursors, processing out comes, and expression of functional recombinant toxine II. *J. Biol. Chem* **264**: 19259-65.
- ❖ Broglio, N. et Goyffon, M. (1980) Les accidents d'envenimation scorpionique. *Concour Méd.* **102** : 5615-5622.

- ❖ Brone, B., tytgat, J., Wang, D.C., Van Kerkhove E. (2003) Characterization of Na⁺ Current in isolated dorsal unpaired median neurons of *Locusta migratoria* and effect of the alpha-like scorpion toxin Bmk M1. *J. Insect Physiol.* **49**: 171-182.

-C-

- ❖ Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., Maelicke A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature (Lond.)* **296**: 90-289.
- ❖ Castle, N.A et Strong, P.N. (1986) Identification of two toxins from scorpion *Leiurus quenequestriatus* venom which block distinct classes of calcium activated K⁺ channels. *FEBS Lett.* **209**: 117-121.
- ❖ Catterall, W.A. (1997) Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J. Biol. Chem* **252**: 8669-8676.
- ❖ Catterall, W.A. (1980) Neurotoxins that act on coltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 15-43.
- ❖ Catterall W.A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Sciences*, **242**: 50-61.
- ❖ Catterall W.A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-sensitive sodium channels. *Physiol. Rev.* **72**: S15-S48.
- ❖ Céstele, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., Catteral, W.A. (1998) Voltage sensor-trapping : enhanced activation of sodium channels by beta-scoprion toxin bound to the S3-S4 loop domain II. *Neuron* **21**: 919-931.
- ❖ Céstele, S., Stankiewicz, M., Mansuelle, P., Dargent, B., De Waard, M., Gille, N., Pelhate, M., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon, D. (1999) Scorpion α -like toxins, toxic to both mammals ans insects, differentially interact with receptor site 3 on voltage-gated sodium channels in mammals and insects. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 975-985.

- ❖ Chavez-Olortegui, C., Lopes, C. S., Cordeiro, F.D., Granier, C., Diniz, C.R. (1993) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Borhrops uwos* and *Lachesis mafa muta* venoms. *Toxicon* **31**: 411-425.
- ❖ Corrêa, M.M., Sampaio, S.V., Lopes, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, A.B., Franco, J.J., Giglio, J.R. (1997). Biochemical and histopathological alteration induced in rat by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin-1. *Tmcm*, Vol **35**, No. 7. pp. 1053-1067.
- ❖ Couraud, F., Jover, E., Dubois, J.M., Rochat, H. (1982) Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* **20**: 9-16.
- ❖ Cruz, L.J. (1988) Conotoxins: Biochemical probes for ion channels and receptors. In “Natural Toxins: Characterization, pharmacology and Therapeutics” Ed. Owenby, C.L. and Odell, G.V. Pergamon press: 66-75.

-D-

- ❖ Dadoune, J.P., Hadjisky, P., Siffroi, J.P. Vendrely, E. (2000) *Histologie*. Edition Flammarion Médecine- Sciences.
- ❖ Daisley, H., Alexander, D., Pitt-Miller, P. (1999) Acute myocarditis following *Tityus trinitatis* envenoming: morphological and pathophysiological characteristics. *Toxicon* **37**: 159–65.
- ❖ Darbon, H., Weber, C., Braun, W. (1991) Two dimensional ¹H nuclear magnetic resonance study of Aah IT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis Hector*. Sequential resonance assignment and folding of polypeptide chain. *Biochemistry* **30**: 1836-1845.
- ❖ Debin, J.A., Maggio, J.E., Strichartz, G.R. (1993) Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* **264** (cell. Physiol. 33). C361-C369.

- ❖ De Davila, C.A.M, Davila, D.F., Donis, J.H., De Bellarbarba, G.A., Villarreal, V., Barbosa, J.S. (2002) Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* **40**: 1339–46.
- ❖ De la Vega, R.C., Possani, L.D. (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon* **46**: 831-844.
- ❖ De-Matos, I.M., Rocha, O.A., Leite, R., Freire-Maia, L. (1997) Lung Oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **118**: 143–8.
- ❖ De-Matos, I.M., Souza, D.G., Seabra, D.G., Freire Maia, L., Texeira, M.M. (1999) Effects of tachykinin NK (1) or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rat. *Eur J Phar* **376**: 296-300.
- ❖ De-Matos, I.M., Talvani, A.O.O.A., Freira-Maia, L., Teixeira, M.M. (2001) Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* **39**: 861.
- ❖ De Rezende, N.A., Borges Dias, M., Campolina, D., Chavez-Olortegni, C., Diniz, C.R., Amaral, C.F.S. (1995) Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpion. *Am J Trop Med Hyg*; **52(3)**: 277–80.
- ❖ De Rezende, N.A., Amaral, C.F.S., Freire-Maia, L., (1998) Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon*, **36**: 1507-1513.
- ❖ Devaux, C., Clot-Faybesse, O., Pugniere, M., Mani, J.C., Rochat, H., Granier, C., (2002) A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J. Immunol. Methods* **271**: 37–46.
- ❖ Devaux, C., Jouirou, B., Krifi, M.N., Clot-Faybesse, O., El Ayebb, M., Rochat, H. (2004) Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon* **43**: 661–669.

- ❖ Dong, K. (1993) Molecular characterization of knockeddown (kdr)-type resistance to pyrethroid insecticides in the German cockroach (*Blattella germanica* L.). Ph.D. dissertation, Cornell University, Ithaca, New York.
- ❖ Droy, J.M., et Leroy, J.P. (2002) Bulletin de la Société de toxicologie Clinique. Infotox- N°15.
- ❖ D'Suze, G., Diaz, P., Salazar, V., Sevcik, C., Brazon, J. (2007) Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* **50**: 16–25.
- ❖ D'Suze, G., Salazar, V., Diaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H., Bracho, N. (2004) Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* **44**: 51–60.
- ❖ Dubreuil, G. et Canivenc, (1967) Manuel théorique et pratique d'histologie. Tom I. Edition Vigot. Paris (6ème édition) 223p.

-E-

- ❖ Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M. et Zoltkin, E. (1990) A scorpion venom neurotoxin paralytic to insect that effects sodium current inactivation: purification primary structure, and mode of action. *Biochemistry* **29**: 5941-5947.
- ❖ El Asmar, M.F., Ibrahim, S.A., et Rabie, F.A. (1972) Fractionation of scorpion (*Leiurus quenquestriatus* H and E) venom. *Toxicon* **10**: 73-7.
- ❖ El Ayeb, M., Delori, P., Rochat, H., (1983) Immunochemistry of scorpion alpha toxins, antigenic homologues checked with radio immunoassays (RIA). *Toxicon* **21**: 709-716.
- ❖ El Hafney, B., Chgoury, F., Adil, N., Cohen, N., Hassar, M., (2002) Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristics of *Androctonus mauretanicus mauretanicus* scorpion venom. *Toxicon* **40**: 1609–1616.

-F-

- ❖ Fainzilber, M., Kofman, O., Zoltkin, E., Gordon, D. (1994) A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs, and acts as an antagonist in rat brain. *J.Biol. Chem.* **269**: 2574-2580.
- ❖ Fontecilla-camps JC., Alamassy, R.J., Suddath, F.I., Watt, D.D., Bugg, C.E. (1980) Three dimensional structure of a protein from scorpion venom : a new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **77**: 6496-6500.
- ❖ Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C., Rochat, H. (1988) Orthorhombic crystal and three dimensional structure of the potent toxin II from *Androctonus australis hector*. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **85**: 7443-7447.
- ❖ Freire-Maia, L. (1983) Neurotoxins as tools for physiological investigation. *Physiologist*. **26**: 81-90.
- ❖ Freire-Maia, L., De Matos, I.M. (1993) Heparin or a PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion in the rat. *Toxicon* **31**:1207-20.
- ❖ Froy, O. et Grevitz, M. (2003) New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure, pharmacology and distribution. *Toxicon* **42**: 549-555.

-G-

- ❖ Garcia, M.L., Hanner, M., Knaus, H.G., Koch, R., Schmalhofer, W., Slaughter, R.S., Kaczorowski, G.j. (1997) Pharmacology of potassium channels. *Adv. Pharmacol.* **39**: 425-471.
- ❖ Garanier, C., Novontny, J., Fontecilla-Camps, J.C., Fourquet, P., El-Ayeb, M., Bahraoui, M. (1989) The antigenic structure of a scorpion toxin. In Goyffon, M. (2000) *Venins et defenses des scorpions*. Ann. Inst. Past. Edition Elsevier, paris : 129-135.
- ❖ Gaudreault, P. Qu'est ce qui m'a piqué ? Un scorpion...(2000) *Bulletin d'Information Toxicologique*. P : 3-4.

- ❖ Ghalim, N., El-hafney, B., Sebti, F., Heikel, J., Iazer, N., Moustansir, R., Benslimane A.(2000) Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am.J.Trop.Med.Hyg* **62**: 277-283.
- ❖ Gille, N., Harrison, G., Karbat, I., Gurevitz, M., Nicholson, G., Gordon, D. (2002) Variation on receptor site-3 on rat brain and insect sodium channels highlighted by binding of a funnel-web spider δ -atracotoxin. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1500-1510.
- ❖ Gitscheir, J., Strichartz, G.R., Hall, L.M. (1980) Saxitoxin binding to sodium channels in head extract from wild-type and tetrodotoxin-sensitive strains of *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta* **595**: 291-303.
- ❖ Gomez, M.V., Diniz, C.R. (1966) Separation of toxic components from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* venom. *Mem.inst. Butantan* **33**: 899-902.
- ❖ Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N., Dong, K., Stühmer, W., Tytgat, J., Gurevitz, M. (2007) The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implication for improved insect control. *toxicon* **49**: 452-472.
- ❖ Gordon, D., Martin-Eauclaire, M.F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Ben Khalifa, R., Pelhate, M., Rochat H. (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Biol. Chem.* **271**: 8034-8045.
- ❖ Gordon, D. et Zoltkin, E. (1993) Binding of an alpha scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential. *FEBS Lett.* **315**: 125-129.
- ❖ Goyffon, M, Chippaux, J.P. (1990) Animaux venimeux terrestres. *Ency Med Chir Paris*.
- ❖ Goyffon, M., El Ayeb, M. (2002) Epidemiologie du scorponisme. *Infotox N°15* : 2-5.
- ❖ Gueron, M, Ilia, R. (1996) Non-cardiogenic pulmonary oedema after scorpion envenomation: a true entity? *Toxicon* **34**: 393-5.

- ❖ Gueron, M., Yarom, R., (1970) Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. *Chest* **57**: 156-162.
 - ❖ Guy, H.R. et Seetharamulu, P. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* **83**: 508-512.
- H-**
- ❖ Hamed, M.I. (2003) Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years experience with serotherapy. *J Antimicrob. Agent* **21**:170–4.
 - ❖ Hamon, A., Gille, N., Sautière, P., Martinage, A., Kopeyan, C., Ulens, C., Tytgat, J., Lancelin J.M., Gordon, D. (2002) Characterization of scorpion α -like toxin group using two new toxins from the scorpion *leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3920-3933.
 - ❖ Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2003) Application du test ELISA pour la quantification du venin d'*Androctonus australis hector* dans les serums de personnes et de rats envenimés avant et après immunothérapie. *Thérapeutique. Bull Soc Pathol Exot*, **96** : 4, 294-301.
 - ❖ Hammoudi-Triki, D., Ferquiel, E., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Choumet, V., Laraba-Djebari, F. (2004) Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *J R Soc Trop Med Hyg.* **98**: 240–250.
 - ❖ Hammoudi-Triki, D., Lefort,J., Rougeot, J., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Laraba-Djebari,F., Choumet, F.V. (2007) Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: Optimization of antivenom therapy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* doi:10.1016/j.taap.2006.11.003.
 - ❖ Erik Harvey-Girard. «Canaux ioniques au sodium» [Apteronote](http://www.apteronote.com). Ed. Erik Harvey-Girard. Ottawa: Dec 7, 2006. < http://www.apteronote.com/revue/neurone/article_90.shtml >
 - ❖ Hille, B. (1992) *Ionic channels of excitable membrans*. Sinauer associates Inc, Sunderland, M.A.
 - ❖ Hille, B. (2001) *Ionic Channels of excitable Membrane* (3rd ed.), Sinauer Associates.

- ❖ Ho, M., Warrell, M.J., Warrell, D.A., Bidwell, D., Voller. A. (1986) A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon* **24**: 211-221.
- ❖ Houllé, R. (1984) *Technique d'histologie et de cytopathologie*. Decarie Editeur, Montréal (4^{ème} édition). P 445.
- ❖ Hommel, D., Hulin, A., Lourenço, W.R., (2000) Accident scorionique létale par *Tityus cambridgei* pocock. *Le concour medical* **122** : 481-484.
- ❖ Housset, D., Habersetzer-Rochat, C., Astier, J.P., Fantecilla-camp, J.C. (1994) Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector refined at 1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **238**: 88-103.

-I-

- ❖ Ismail, M. Review article: the scorpion envenoming syndrome. (1995) *Toxicon* **33**:825–58.
- ❖ Ismail, M., Abd Elsalem, A., (1988) Are the toxicological effects of scorpions envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon* **26**: 233-256.
- ❖ Ismail, M., Abdullah, M.E., Morad, A.M., Ageel, A.M. (1980) Pharmacodistribution of ¹²⁵I-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*, AUD and SAV. *Toxicon* **18**: 301-308.
- ❖ Ismail, M. (1993) Serotherapy of the scorpion envenomation syndrome is irrationally conducted without trials. *Toxicon* **31**: 1077-1083.

-J-

- ❖ Jover, E., Couraud, F., Rochat, H. (1980) Two types of scorpions neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **95**: 1607-1614.

-K-

- ❖ Kopeyan, C., Mansuelle, P., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H. Miranda, F. (1993) Characterization of toxin III of scorpion *Leiurus quinquestriatus* : a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insect. *Natural toxins* **1**: 308-312.

- ❖ Krifi, M.N., El Ayeb, M., dellagi, K. (1995) New procedure and parameters for the better evaluation of *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomation and specific serotherapy treatment. *Toxicon* **34**: 257-266.

- ❖ Krifi, M.N., Kharrat, H., Zghal, K., Abdouli, M., Abroug, F., Bouchoucha, S., Dellagi, K., El Ayeb, M., (1998) Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera on humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon* **36**: 887–900.

- ❖ Krifi, M.N., Miled, K., Abderrazek, M., El Ayeb, M., (2001) Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* **39**: 1317–1326.

- ❖ Krifi, M.N., Miled, K., Choumet, V., Bon, C., El Ayeb, M., (2002) Anti-scorpion immunotherapy: facts and perspectives. In: Goudey-Perriere, F., Bon, C., Puiseux-Dao, S., et Sauviat, M.P. (Eds.), *Toxines et recherches biomédicales*, Editions scientifiques et médicales, Elsevier, Paris, pp. 253–266.

- ❖ Krimm, I., Gille, N., Sautiere, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gordon, D., Lancelin, J.M. (1999) NMR structure and activity of novel α -like toxin from the scorpion *leiurus quinquestriatus hebraeus*. *J. Mol. Biol.* **285**: 1749-1763.

-L-

- ❖ Lacombe, M. (2007) *Le Lacombe, précis d'anatomie et de physiologie humaines*. Tom 1. Edition LAMARRE.

- ❖ Landon, C., Sodano, P., Cornet, B., Bonmatin, J.M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F., Ptak, M., (1997) Refined solution structure of the anti-mammal and anti-insect Lqq III scorpion toxin: comparison with other scorpion toxins. *Proteins* **28**: 360-374.
- ❖ Laraba-Djebari, F. (1996) Etude des polypeptides pharmacologiquement actifs à partir du venin de la vipère *Cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis hector*, purification, caractérisation biochimique et pharmacologique. Thèse de Doctorat à l'USTHB.
- ❖ Leberton, F., Delepierre, M., Ramirez, A.N., Balderas, C., Possani, L.D. (1994). Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centroroïdes limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry* **33**: 11135-11149.
- ❖ Letonturier, P., (1998) Abregé en Immunologie Générale. Edition Masson, (6 éme édition) P 23.
- ❖ Little, M.J., Wilson, H., Zappia, C., Cestele, S., Tyler, M.I., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon D., Nicholson, G.M. (1998) Delta Atractoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett*, **439**: 246- 252.

-M-

- ❖ Maillet, M. (1980) Histologie des organes. PCEM2. Edition etudes vivantes.
- ❖ Mantegazza, M., Cestele, S. (2005) In press. Beta scorpion toxin effects suggest electrostatic interaction in domain II of voltage-dependant sodium channels. *J. Pysiol.* **568**: 13-30. (doi: 10.1113/jphysiol.2005.093484).
- ❖ Martin-Eauclaire, M.F., Legros, C., Bougis, E.P., Rochat, H. (1999) Les toxines Des venins de scorpion. *Annale de l'Institut Pasteur* **10** : 207-222.
- ❖ Martin-Eauclaire, M.F. Couraud, F. (1995) Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: Chang LW. Dyer, RS (Eds.), *Handk. Neurotoxicology*. Marcel Dekker, NY, pp. 683-617.

- ❖ Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H. (1984a) Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the North African scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Toxicon* **22**: 279-291.
- ❖ Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H. (1984b) Purification and amino-acid sequence of toxin I'' from *Androctonus australis Hector*. *Toxicon* **22**: 695-703.
- ❖ Mejri, T., Borchani, L., Srairi-Abid, N., Benkhalfi, R., Cesteh, S., Regaya, I., Karoui, H., Pelhate, M., Rochat, H., El Ayeb, M. (2003) BotIT6: a potent depressant insect toxin from Bot venom. *Toxicon* **41**: 163-171.
- ❖ Menez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Toma, F. (1992) Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proc. R. Soc. Edinburg* **99B**: 83-103.
- ❖ Mikou, A., La Plante, S.R., Guittet, E., Lallemand, J.Y., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H. (1992) Toxin III from *Androctonus australis hector*: proton nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure. *J. Biomol. NMR* **2**: 57-70.
- ❖ Miller, C., Moczydlowski, E., Iattore, R., Philips, M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of signal Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature (lond.)* **313**: 316-318.
- ❖ Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, C., Zinn-Justin, S. (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterisation of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus*
- ❖ Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M. et Sabatier, JM. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ions channels. *Biochem. J.* **378**, 717-726.
- ❖ Murugesan, S., Radha Krishna Murthy, K., Noronha, O.P.D., Samuel, A.M. (1999) Tc 99m-scorpion venom: labeling, biodistribution and scintimaging. *J. Venom. Anim. Toxins* **5**,1.

- ❖ Oren, DA., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M. et Shaanan, B. (1998) An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature : an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure* 6, 1095-1103.

-P-

- ❖ Padilla, A. Govezensky, T. Possani, L.D., Larralde, C. (2003) Experimental envenoming of mice with venom from scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: difference in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon* **41**: 959-965.
- ❖ Pauron, D., Barhanin, J., Lazdunski, M. (1985) The voltage-dependant Na^+ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin, and scorpion and sea anemone toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**: 1226-1233.
- ❖ Pepin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J., et Scherrmann, J.M., (1996) Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')₂ scorpion venom interactions. *Toxicol Appl Pharmacol*, **146**: 272-277.
- ❖ Possani, L.D. (1984) Structure of scorpion toxins. In *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T.,ed), Vol .2., pp 513-550. Marcel Dekker, Inc., New York.
- ❖ Possani, L.D., Bercerril, B., Delepierre, M., et Tytgat, J. (1999) Scorpion toxins specific for Na^+ channels. *Eur. J. Biochem.* **264** : 287-300.
- ❖ Possani, L.D., Martin, B., Svendsen I. (1982) The primary structure of noxiutoxin: a K^+ channels blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides Noxius Hoffmann*. *Carlsberg Res. Comm.* **47**: 285-289.

-R-

- ❖ Revelo, M.P., Bambira, E.A., Ferreira, A.P., Diniz, R.C., Chavez-Olorteguf, C., (1996) Body Distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice. Effects of scorpion antivenom. *Toxicon*. Vol. **34**, No. IO. pp. II 19-I 125.

- ❖ Rivière, G., bon, C. (1999) Immunothérapie anti venimeuse des envenimations ophidiennes: vers une approche rationnelle d'un traitement empirique. *Annales de l'Institut Pasteur* **10** : 2, 173-182
- ❖ Rochat, H., Bernard, P., Couraud, F. (1979) Scorpion toxins: Chemistry and mode of action. In *Advances in Cytopharmacology* (Ceccarelli B. et Clement F.), Vol. **3**, pp. 325-334. Raven press, New York.
- ❖ Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheurer, T., Catterall W.A. (1996) Molecular determination of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin on the S3-S4 extracellular loop in domain VI of the Na^+ channel alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **271**: 15950-15962.

-S-

- ❖ Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M.F., Laraba-Djebari, F. (2008) Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment. *International Immunopharmacology* **8**: 1386–1394.
- ❖ Schichor, I., Fainzilber, M., Pelhate, M., Malecot, C.O., Zoltkin, E., Gordon, D. (1966) Interactions of δ -conotoxins with alkaloid neurotoxins reveal difference between the silent and effective binding sites on voltage-sensitive sodium channels. *J. Neurochem.* **67**: 2451-2460.
- ❖ Schichor, I., Zoltkin, E., Ilan, N., Chikashvili, D., Stuhmer, W., Gordon, D., Lotan, I. (2002) Domain 2 of Drosophila para voltage-Gated sodium channel confers insect properties to a rat brain channel. *J. Neurosci.* **22**: 4364-4371.
- ❖ Soderlund, D.M., Grubs, R.E., Adams, P.M., (1989) Binding of [³H] batrachotoxinin A-20nezoate to a high affinity site associated with house fly head membranes. *Comp. Biochem. Physiol.* **94C**: 255-260.
- ❖ Sun, Y.M., Bosmans, F., Zhu, R.H., Goudet, C., Kiong, Y.M., Tytgat, J., Wang, D.C. (2003) Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion alpha-toxin BmK M1: the hydrophobic surface region revisited. *J. Biol. Chem.* **278**: 24125-24131.

-T-

- ❖ Tejedor, F.J., Catterall, W.A. (1988) Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **85**: 8742-8746.
- ❖ Theakston, R.D.G. (1983) The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon* **21**: 341-352.
- ❖ Theakston, R.D.G., Lloyd-Jones M.J., Reid H.R.A. (1977) Micro ELISA for detecting and assaying snake venom-antibody. *Lancet* ii, 639-641.
- ❖ Ternyck, T., Avrameas, S. (1991) *Techniques immunoenzymatique*. Edition Pradel, p 726.
- ❖ Trainer, V.L., McPhee, J.C., Boutelet-Bochan, H., Baker, C., Scheur, T., Babin, D., Demoute J.P., Guedin, D., Catterall, W.A. (1997) High affinity binding of pythetroids to the α -subunit of brain sodium channels. *Mol. Pharmacol.* **51**: 651-657.

-V-

- ❖ Valdivia, H., Possani, L.D (1998) Peptide toxins as probes of Ryanodin receptor. *Trends Cardiovascular Med.* **8**:111-118.
- ❖ Vargas, O., Martin, M.F., Rochat, H. (1987) Characterization of six toxins from the venom of the Moroccan scorpion *Buthus occitanus mardochei*. *Eur. J. Biochem.* **162**: 589-599.
- ❖ Voet, D., Voet, J.G. (2004) *Biochimie*. 2nd edition. Edition De boeck.

-W-

- ❖ Wang, CG., Gilles, N., Hamon, A., Le Gall, F., Stankiewicz, Z., Pelhate, M., Xiong, YM., Wang, DC., Chi, C.W. (2003) Exploration of the functional site of a scorpion alpha-toxin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **42**: 4699-4708.
- ❖ Watt, D., Simard, J.M. (1984) Neurotoxic proteins in scorpion venom. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **3**: 181-221.

- ❖ Weil, J.H. (2005) Biochimie générale 10^{ème} édition. Edition Dunod.

-Y-

- ❖ Yu, FH., Catterall., W.A. (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* **4**: 207.

-Z-

- ❖ Zeghal, K, Sahnoun, Z, Guinot, M, Richer, C., Giudicelli, JF. (2000) Characterization and mechanism of cardiovascular and hemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. *Fundam Clin Pharmacol*; **14**: 351–61.
- ❖ Zerrouk, H., Mansuelle, P., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F. (1993) Characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii kirsch*. *Peptides* **25**: 143-150.
- ❖ Zoltkin, E. (1997). Insect selective neurotoxins from scorpion venom affecting sodium conductance. In: Lazarovici, P., Gutman Y. (Eds), *Toxins and signal transduction. Cellular and Molecular Mechanisms of Toxin Action Series*. Harwood Press, Amsterdam, pp. 95-117.
- ❖ Zoltkin, E., Miranda, F., Rochat, H. (1978) Chemistry Pharmacology of *Butinae* scorpion venoms. In *Handbook of Experimental Physiology* (Bettini, S., ed), Vol **48**: PP. 317-369. Springer-Verlag, Heidelberg.

Abstract: Bot III toxin is an α neurotoxin purified from *Buthus occitanus tunetanus* venom one of the most dangerous scorpions in Algeria. It binds to site 3 of sodium channel of excitable cells and blocks its inactivation.

The aim of this work is to study the biodistribution of the toxin Bot III in the different compartments by application of ELISA sandwich test, and to analyze the histopathologic effects induced by this toxin in the organs (heart, lung and liver), in the presence and absence of immunotherapy, after experimental envenomation. The results of our study showed that the absorption, distribution and elimination of this toxin are very fast. The Bot III toxin appears in serum 15 min after subcutaneous injection, peaked in serum and organs within 30 min after envenomation. After 3 hours the concentration of the toxin is very low and undetectable at 24 hours after its injection. These results show that scorpion envenomation is a case of extreme emergency that requires rapid and specific treatment.

The biodistribution study is complemented by an analysis of the histopathological effects induced by toxin Bot III in the organs (heart, lung and liver). Histology study showed that the Bot III toxin induced tissue damage represented by hemorrhage, edema, infiltration of inflammatory cells, congestion and thickening of intra-alveolar walls. Such tissue damage is due to the increased release of neurotransmitters (catecholamines and acetylcholine) that will induce the activation of endogenous phospholipase.

The use of Immunotherapy shows that specific immune serum causes partial neutralization of tissular lesions. This is due to the difference in pharmacokinetics between the toxin which presents a rapid biodistribution and antibodies which have slower biodistribution. Therefore, it is recommended to use smaller neutralizing fragments.

ملخص: التوكسين Bot III هي توكسين من نوع α مصفاة من سم العقرب *Buthus occitanus tunetanus* الذي يعتبر من أخطر العقارب في الجزائر . هذه التوكسين تثبت بالموقع 3 للقناة الناقلة لشوارد Na^+ المتواجدة في الخلايا العصبية و تمنع تثبيطها.

الهدف من عملنا هو دراسة التوزيع البيولوجي للتوكسين Bot III على مختلف أجزاء الحيوان بواسطة ELISA sandwich و تحليل الأثار النسيجية المترتبة عن هذه التوكسين في الأعضاء (القلب, الرئة و الكبد) بوجود أو غياب العلاج المناعي بعد تسمم تجريبي.

أظهرت نتائج دراستنا أن التوكسين Bot III تملك امتصاصا , توزيعا و ا طرحا سريعين . هذه التوكسين تظهر في المصل بعد 15 دقيقة من التسمم و يبلغ تركيزها ذروته بعد 30 دقيقة من التسمم و بعد 3 ساعات يصبح تركيزها منخفض. بعد 24 ساعة يصبح تركيز التوكسين غير مكشوف. هذه النتائج تثبت ان التسمم العقربي حالة طارئة جدا و نحتاج إلى علاج سريع و محدد.

استكملت دراسة التوزيع البيولوجي بتحليل الأثار النسيجية المتسببة من طرف التوكسين على مستوى الأعضاء (القلب, الرئة و الكبد). أظهر تحليل الأنسجة ان Bot III تحدث اختلال نسيجي متمثل في نزيف , انتفاخ, تسلل خلايا التهابية, تثخن الجدران التجويفية, احتقان الدم. هذه الاختلالات قد تكون بسبب إفراز كمية كبيرة من النواقل العصبية (استيل كولين و كاتيكولامين) التي تنشط الفوسفوليبيزات الخلوية.

بين العلاج المناعي أن استعمال المصل المناعي الخاص ب Bot III يؤدي إلى تعديل جزئي للاختلالات المتسببة من طرف التوكسين, قد يكون هذا بسبب الاختلاف في التوزيع البيولوجي بين التوكسين التي تملك توزيعا سريعا و الجسم المضاد الذي يملك توزيعا اقل سرعة, لذا فانه ينصح باستعمال شظايا معدلة ذات وزن جزيئي صغير.